

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C07K 14/46, C12N 15/12, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, A61P 25/00, 9/00, 13/00, 27/00, G01N 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO00/32637 2000年6月8日(08.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP9906649 1999年11月29日(29.11.99) (23) 国際公開日 1998年11月30日(30.11.98) 1999年3月4日(04.03.99) 1999年3月26日(26.03.99) (30) 優先権データ 特願平10033984 特願平1126848 特願平1123967 (71) 出願人 (本国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP) (72) 発明者 および 発明者/出願人 (本国についてのみ) 森 正明(MORI, Masahiro) 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 内田孝子(ABE, Michiko) 〒300-1252 茨城県常陸県常陸町高見原4丁目3番15番地 (JP) 〒300-0035 茨城県つくば市伏代2丁目12番地1 武田薬品工業株式会社 〒305-0035 茨城県つくば市伏代2丁目12番地1 武田薬品工業株式会社 〒305-0035 茨城県つくば市伏代2丁目12番地1	(12) 国際公開番号 WO00/32637 2000年6月8日(08.06.00)	(13) 国際公開番号 WO00/32637 2000年6月8日(08.06.00)
(54) Title: NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND UTILIZATION THEREOF (54) 発明の名称 新規生理活性物質、その製造法および用途 (57) Abstract A novel peptide recognized as a ligand by a G protein-coupled receptor protein. The above peptide is usable in: (1) developing a receptor-bonded assay system and screening a candidate compound for a drug with the use of a recombinant receptor protein expression system; and (2) developing drugs such as a central function controlling agent, a circulatory function controlling agent, a heart function controlling agent, an immunological function controlling agent, a digestive function controlling agent, a metabolic function controlling agent or a genital function controlling agent.	(14) 代理人 高橋秀一、外(TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番83号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)	(15) 代理人 高橋秀一、外(TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番83号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)

明 細 書

新規生体活性物質、その製造法および用途

技術分野

5 本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質であるSENR (sensory epithelium neuropeptide-like receptor) に対するリガンド活性を有する新規ポリペプチド及びこれをコードするDNAなどに関する。

背景技術

10 多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある) の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行い、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは

15 7回膜貫通型レセプターと総称される。

このようなホルモンや神経伝達物質とG蛋白質共役型レセプターとの相互作用を通じて生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節、感覚受容などの生体にとって重要な機能調節が行われている。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質に対するレセプター蛋白質が存在し、その機能調節に重要な役割を果たしていることがわかっているが、未知の作用物質 (ホルモンや神経伝達物質など) およびそれに対するレセプターが存在するかどうかについては未だ不明なことが多い。

近年、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がその構造の一部にアミノ酸配列の類似性を示すことを利用して、ポリメラゼ・チェーン・リアクション

(Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する) 法によって新規レセプター蛋白質をコードするDNAを探索する方法が行われるようになり、数多くのリガンドが不明ないわゆるオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質がクローニングされている(Liberti, F., et al. Science, 244, 569-572, 1989,

5 Welch, S.K., et al., Biochem Biophys. Res. Commun., 209, 606-613, 1995, Marchese, A., et al., Genomics, 23, 609-618, 1994, Marchese, A., Genomics, 29, 335-344, 1995)。また、ゲノムDNAあるいはcDNAのランダムな配列決定によっても、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質が次々と見だされていく(Nomura, N., et al., DNA Research 1巻, 27-35頁, 1994年)。これらのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを決定する一般的な手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一次構造上の類似性から推定するしかなかった。しかし、多くのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質は既知のレセプターとのホモロジーが低いものも多く、実際は既知リガンドのレセプターサブタイプである場合を除いては一次構造上の類似性だけでそのリ

15 ガンドを推定することは困難であった。一方、遺伝子解析から多くのオーファンG蛋白質共役型レセプターがみつかったことから対応する未知のリガンドはまだ数多く存在していることが推定されているが、これまで実際にオーファンG蛋白質共役型レセプターのリガンドを同定した例は数少ない。

最近、動物細胞にオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする(cDNA)を導入し、新規オピオイドペプチドを探索した例が報告されている(Reinscheid, R. K. et al., Science, 270巻, 792-794頁, 1995年, Menular, J.-C., et al., Nature 377巻, 532-535頁, 1995年)。しかしこの場合は既知G蛋白質共役型レセプター蛋白質との類似性や組織分布から、容易にリガンドはオピオイドペプチドのファミリーに属することが予想されていた。オピオイドレセプターを介して生体に作用する物質の研究・開発の歴史は長く、種々のアンタゴニスト・アゴニストが開発されていた。そこで人為的に合成した化合物群の

20 25

中からこの受容体に対するアゴニストを見出し、それをプローブとして受容体 cDNA 導入細胞における受容体の発現を検証した後に、アゴニストと同じ様な細胞内情報伝達系の活性化物質を探索し、これを精製し、リガンドの構造を決定している。

5 またカタツムリのオーファンG蛋白質共役型レセプター (GRL104) をコードする cDNA を CHO 細胞に導入してレセプター発現細胞での特異的な細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を指標として新規生理活性ペプチドを同定した例が報告されているが (Cox, K. J. A., et al., J. Neurosci., 17(4), 1197-1205, 1997)、この新規生理活性ペプチドは既知の leucokinin と高い相同性を有し、GRL104 は既知の leucokinin との反応性もあった。このようにオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の中でリガンドがおおよそ推定されるものはほとんどなく、特に、既知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーと類似性が低い場合、リガンドに関する情報はほとんどなく、リガンドを推定することは困難であった。

15 オーファンG蛋白質共役型レセプターとして報告されているものの一つに SENR がある (Tal, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 752-759, 1995)。SENR はソマトスタチンレセプター (SSTR4) と低いホモロジーがあるが、そのリガンドが何であるのかはこれまで不明であった。なお、Marchese, A. らによって報告された GPR14 (Marchese, A., Genomics, 29, 335-344, 1995) は SENR と同一のレセプターである。中枢神経系、循環器系、生殖器官、免疫系、消化器、泌尿器系器官、感覚器官等で発現しているG蛋白質共役型レセプターである SENR に対するリガンドは、医薬品として有用であると考えられるが、これまでにその構造および機能については明らかにされていない。

発明の開示

本発明者らは、SENR をコードする cDNA を適当な手段で発現させた細胞を用い、特異的な細胞刺激 (シグナル伝達) 活性の測定等を指標に、該レセプター蛋白質がリガンドとして認識するポリペプチドをスクリーニングすることによって成功した。

5 さらに、本発明者らは、該活性因子であるリガンドと上記 SENR との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができることを見いだした。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：7 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

10 ミノ酸配列が配列番号：8 または配列番号：21 で表されるアミノ酸配列である上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

15 (3) 上記 (1) 記載のポリペプチドの前駆体タンパク質またはその塩、

(4) 配列番号：18 または配列番号：19 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記 (3) 記載の前駆体タンパク質またはその塩、

20 (5) 上記 (1) 記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA を含有する DNA、

(6) 配列番号：27 または配列番号：28 で表される塩基配列を有する上記

(5) 記載の DNA、

(7) 上記 (3) 記載の前駆体タンパク質をコードする塩基配列を有する DNA を含有する DNA、

25 (8) 配列番号：15、配列番号：16 または配列番号：17 で表される塩基配列を有する上記 (7) 記載の DNA、

(9) 上記 (5) または上記 (7) 記載の DNA を含有する組換えベクター、
(10) 上記 (9) 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(11) 上記 (10) 記載の形質転換体を培養し、上記 (1) 記載のポリペプチドまたは上記 (3) 記載の前駆体タンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記 (3) 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩の製造法、

(12) 上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記 (3) 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩に対する抗体、

(13) 上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記 (3) 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩を含有してなる医薬、

(14) 上記 (5) または上記 (7) 記載の DNA を含有してなる医薬、

(15) (15) 中枢機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤または感覚器官機能調節剤である上記 (13) または上記 (14) 記載の医薬、

(16) 上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または上記 (3) 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩を用いることを特徴とする S E N R と上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記 (3) 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(17) 上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記 (3) 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩を含有してなる S E N R と上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミド

もしくはそのエステルまたはその塩、または上記 (3) 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングキット、

(18) 配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする S E N R と配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(19) 配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる S E N R と配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングキット、

(20) 上記 (16) もしくは上記 (18) 記載のスクリーニング方法または上記 (17) もしくは上記 (19) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、① S E N R と上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記 (3) 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩、または② S E N R と配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(21) 上記 (20) 記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする高血圧症の予防・治療薬、

(22) 上記 (12) 記載の抗体を用いることを特徴とする上記 (1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記 (3) 記載のタンパク質もしくはその塩の定置方法、および

(23) 上記 (12) 記載の抗体を含有することを特徴とする上記 (1) 記載

のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の前駆体タンパク質もしくはその塩の機能が関与する疾患の診断などに関する。

さらに、本発明は、

5 (24) 哺乳動物由来である上記(1)項記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(3)記載の前駆体タンパク質もしくはその塩、および

(25) 高(低)血圧症、腎疾患、心疾患、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚異常、視覚異常などの疾病の治療・予防剤である上記(13)または(14)記載の医薬などを提供するものである。本発明におけるポリペプチドに対するSE
10 NRに関して、具体的には、上述の公知のSENRまたはその塩などがあげられるのみならず、

(26) 配列番号：9または配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするSENRまたはその塩、または

(27) SENRが、配列番号：9または配列番号：26で表されるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：9または配列番号：26で表されるアミノ酸配列に1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加した(または挿入された)アミノ酸配列、あるいは配列番号：9または配列番
20 号：26で表されるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(26)項記載のSENRまたはその塩などに関する。

25 図面の簡単な説明

図1はラット全脳cDNAを用いてPCR法によって単離したラットSENRのcDNA配列

を示す(配列番号：3)。

図2はブタ脊髄抽出物から調製したHPLCフラクションについてCHO/SENR細胞株からのアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した結果を示す図を示す。

5 図3は実施例6中のHPLC分画133のアラキドン酸代謝物遊離活性のプロナール処理に対する挙動を示す図を示す。

図4は実施例7中のCCKカラム(Develosil CN-UG-5)で精製した画分についてCHO/SENRに特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した結果を示す図を示す。

10 図5は実施例7中のCCKカラム(Develosil CN-UG-5)で精製した画分についてCHO/SENRに特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した結果を示す図を示す。

図6は実施例7中のODSカラム(Wakosil-II 3C18HG)で精製した画分についてCHO/SENRに特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した結果を示す図を示す。

15 図7は実施例7中のODSカラム(Wakosil-II 3C18HG)で精製した画分についてCHO/SENRに特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した結果を示す図を示す。

20 図8はブタ脊髄cDNAより単離したブタSENRリガンド前駆体蛋白質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるブタSENRリガンド前駆体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

図9はSENRリガンドポリペプチドの配列である。

図10は合成ブタSENRリガンドのCHO/SENR細胞株に対するアラキドン酸代謝物遊離活性を示す図を示す。

25 図10は合成ブタSENRリガンドのラット胸部大動脈リング標本に対する収縮活性を示す図を示す。

図 1 1 は合成ヒト SENR リガンド (ヒト urotensin II) の CHO/hSENR 細胞株に対するアラキドン酸代謝物遊離活性を示す図を示す。

図 1 2 は合成ウシ SENR リガンドの CHO/SENR 細胞膜画分に對する結合活性を示す図を示す。

5 図 1 3 は合成ヒト SENR リガンドの CHO/hSENR 細胞膜画分に對する結合活性を示す図を示す。

図 1 4 はウシ全脳 cDNA より単離したウシ SENR リガンド前駆体蛋白質 cDNA の全塩基配列およびそれから翻訳されるウシ SENR リガンド前駆体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。□で囲まれた配列は、ウシ SENR リガンドポリペプチドの配列である。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、「實質的に同一」とはポリペプチドまたはタンパク質の活性、例えば、リガンドと受容体 (SENR) の結合活性、生理的な特性などが、實質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入はしばしばポリペプチドまたはタンパク質の生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失、付加あるいは挿入のされて

20 ないものと同質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸配列中のアミノ酸のうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性 (疎水性) アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどがあげられる。極性 (中性) アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどがあげられる。陽電荷をもつ (塩基性) アミノ

酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどがあげられる。負電荷をもつ (酸性) アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられる。

本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩は、SENR に対するリガンドであり、具体的には、配列番号：7 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは實質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などがあげられる。

本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩 (以下、単に本発明のポリペプチドと称する場合がある)、その製造法および用途を以下にさらに詳細に説明する。

本発明のポリペプチドとしては、ヒトや温血動物 (例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど) のあらゆる組織 (たとえば、下垂体、膵臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、腎臓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など) または細胞などに由来するポリペプチドであって、配列番号：7 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは實質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであれば如何なるものであってもよい。

例えば、本発明のポリペプチドとしては、配列番号：7 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：7 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと實質的に同質の活性を有するポリペプチド (例えば、配列番号：8 または配列番号：21 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなど) などがあげられる。實質的に同質の活性としては、例えば、レセプター結合活性、シグナル伝達活性などがあげられる。實質的に同質とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子重などの量的要素は異なってもよい。

配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとして具体的には、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドのN末端から3番目のアミノ酸 (Thr) が他のアミノ酸 (例、Ala, Leu, Ile, Val, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Cys, Tyr, Asn, Gln, Arg, Lys, His, Asp, Glu) に置換されているアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。なかでも、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドのN末端から3番目のアミノ酸 (Thr) がPrrに置換されているアミノ酸配列 (配列番号：8) を含有するポリペプチドおよび配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドのN末端から3番目のアミノ酸 (Thr) がSerに置換されているアミノ酸配列 (配列番号：21) などが好ましい例としてあげられる。

本明細書におけるポリペプチドはペプチド配列の慣例に従って左端がN末端 (アミノ末端)、右端がC末端 (カルボキシル末端) である。①配列番号：7で表されるアミノ酸配列、②配列番号：8で表されるアミノ酸配列、③配列番号：21で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列などを含有するポリペプチドはC末端が通常カルボキシル基 (-COOH) またはカルボキシレート (-COO⁻) であるが、C末端がアミド (-CONH₂) またはエステル (-COOR) であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₈アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキルなどのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるジバロイルオキシメチル基などがあげられる。

本発明のポリペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基 (例えばアルカリ金属など) や酸 (有機酸、無機酸) との塩が用いられるが、とりわけ生

理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、半酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸) との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞からポリペプチドを精製する方法によって製造することもできるし、後述のポリペプチド合成法に準じて製造することもできる。また、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

ヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸、有機溶媒などで抽出を行い、抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせて、あるいは本発明のポリペプチドは、自己公知のポリペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のポリペプチドを含有するポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のポリペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残基部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①~⑤に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti, ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
②SchroederおよびLuebkke, ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New

York (1965年)

- ③泉屋信也、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
 ④矢島治明 および仲原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

5 ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製分離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが逆離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができる。逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって逆離体に変換することができる。

ポリペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAN樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル)-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドを得る。

25 上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カ

ルボジイミド類としてはDOC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどがあげられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOBt、HOBt)とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOBtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうるものが知られている溶媒から適宜選択される。たとえばN,N'-ジメチルホルムアミド、N,N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。15 反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5ないし4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Roc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、CI-Z、Bt-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニ

ル、ジフエニルホスフィノチオイル、Fmocなどがあげられる。カルボキシシル基の保護基としては、たとえばRとして上記したC₁₋₆アルキル基、C₃₋₆シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどがあげられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などがあげられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-2、ターシャリーブチルなどがあげられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bom、Boc、Trt、Fmocなどがあげられる。

原料のカルボキシシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキスクシミド、N-ヒドロキシフタリイミド、HOBt）とのエステル〕などがあげられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドがあげられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれら

の混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元などもあげられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃〜40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

15 ポリペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の煩長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要成分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。

25 ポリペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペ

チドのアミド体と同様にして所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のポリペプチドとしては、上記した配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、該ポリペプチドと同様の作用、例えば中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用または感覚器官機能調節作用などを有しているものであれば、どのようなポリペプチドであってもよい。このようなポリペプチドとしてはたとえば、上記した配列番号：8または配列番号：21で表されるアミノ酸配列を有するペプチドをあげることができる。

本発明のポリペプチドはさらに該ポリペプチドに対する抗体の調製のための抗原として用いることができる。このような抗原としてのポリペプチドは上記した本発明のポリペプチドの他に、上記本発明のポリペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドなどが用いられる。

部分ペプチドとしては、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本明細書における部分ペプチドもC末端がアミド (-CONH₂) またはエステル (-COOR) であってもよい。ここでエステル基の例としては上記したポリペプチドの場合と同様である。該部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートをも有している場合、それらの基がアミドまたはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば、上記したC末端のエステルなどが用いられる。

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドは、さらに、機能あるいは性質がよく知られているタンパク質との融合タンパク質であってもよい。

本発明のポリペプチドの部分ペプチドの塩としては、前述のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩は、上記した本発明のポリペプチドの場合と同様の合成法に従って、あるいは本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記した組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいづれであってもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

ここで、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、上述のとおり、配列番号：8または配列番号：21で表されるアミノ酸配列などがあげられるが、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：27で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、配列番号：21で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：28で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：27または配列番号：28で表される塩基配列と約80%以上、好ま

しくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

また、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば

それに基づいた方法に従って行うことができる。上記ストリンジエントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄・H₂O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1%SDSである。

5 配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の7ミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：27または配列番号：28で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

また、本発明の①配列番号：7で表されるアミノ酸配列、②配列番号：8で表されるアミノ酸配列、③配列番号：21で表されるアミノ酸配列などを含有するポリペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を含有するDNA断片は、DNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

15 本発明のポリペプチドをコードするDNAは以下の遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自他公知のPCR法によって筋配DNAライブラリー等から目的とする

20 酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合能を有するDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズする哺乳動物由来のDNA、(2) 遺伝コードの縮重のため配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質に対する結合能を有するDNAを含有するDNAの有する配列および(1)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいは25

25 などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。

クローン化された本発明のポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有している。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHIプロモーター、GALプロモーターなどが

好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカ、SV40複製オリジン (以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、dhfrと略称する場合がある) 遺伝子 (メソトレキセート (MTX) 耐性)、アンピシリン耐性遺伝子 (以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性)等があげられる。特に、CHO(dhfr⁻)細胞を用いてDHFR遺伝子を選択マーカとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、phoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクターα(MFα)・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 (プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・

サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 60巻, 160(1968)) , JM103 [ヌクレック・アシーズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research) , 9巻, 309(1981)] , JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)] , 120巻, 517(1978)) , HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)] , C600 [ジェネティクス (Genetics) , 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) MI114 (ジーン, 24巻, 255(1983)) , 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) , 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス、セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。

15 昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる (前田ら、ネイチャー (Nature) , 315巻, 592(1985)) 。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Sponoptera frugiperda cell; Sf細胞) , Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞, Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM 細胞, Manesira brassicae由来の細胞またはEstigmene acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711) , Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ (in Vitro) , 13巻, 213-217頁 (1977年)) などが用いられる。

25 動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO、DHTFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CH

O (dhfr CHO細胞) , マウスL細胞, マウス3T3細胞, マウスミエローマ細胞, ヒトHEK293細胞, ヒトFL細胞, 293細胞, C127細胞, BALB3T3細胞, Sp-2/O細胞などが用いられる。

5 エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene) , 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。

バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なわれる。

10 酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

15 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ/テクノロジー (Bio/Technology) , 6巻, 47-55頁 (1988年) などに記載の方法に従って行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばウイルス (Virology) , 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

20 発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法 (Felgener, P.L. et al. プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) , 84巻, 7413頁 (1987年)) , リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van der Eb, A

25 J. ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456-467頁 (1973年)) , 電気穿孔法 (Nucmann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) , 1巻, 8

41-845頁(1982年)等があげられる。

このようにして、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

5 なお、動物細胞を用いて、本発明のポリペプチドを安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより本発明のポリペプチドの高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができ10 る。また、dhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子とともに、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチド等をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることができる。

15 上記の形質転換体の本発明のポリペプチドをコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のポリペプチドを生成、蓄積せしめることによって、本発明のポリペプチドを製造することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含ませしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

25 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミ

ノ酸を含むM9培地(ミラー(Miller)、ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Journal of Experiments in Molecular Genetics)、431-433、Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972)が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

10 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー(Burkholder)最小培地(Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユ15 ーエスエー」(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、77巻、4505(1980))や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地(Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユエスエー」(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、81巻、5330(1984))があげられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培20 養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature) 195, 788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約325 ~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約

5 5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)), DMEM培地 (ウイルス学 (Virology), 8巻, 396(1959)), RPMI 1640培地 (ジャーナル・オブ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)), 199培地 (プロシーディング・オブ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950))などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

10 特にCHO (dhfr⁻) 細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば下記の方法により行うことができる。

15 本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク変性剤や20 , トリトンX-100 (登録商標。以下、TMと省略することがある。) などの界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

25 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの

溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマトフォカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

5 かくして得られる本発明のポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

10 なお、組換え体が産生する本発明のポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニンエンドペプチダーゼ、プロテinkinナ

15 ーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドの存在は特異抗体を用いたエンザイムムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAまたは本発明のポリペプチドは、

①本発明のポリペプチドの有する生理作用の標索、②合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、③SEN Rのリガンドや前駆体タンパク質をコードするDNAの入手、④組換え型レセプタータンパク質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤抗体および抗血清の入手、⑥DNA、RNA、抗体または抗血清を用いた診断法の開発、⑦中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤、感覚器官機能調節剤などの医薬品の開発、⑧遺伝子治療等に用いることができる。

特に、後述の組換え型SENRの発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なSENRアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

- 5 さらに、上記⑦に關し、本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAは中枢神経系、循環器系、心臓、腎臓、泌尿器系または感覚器官などで発現しているSENRがリガンドとして認識するものであるので、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覚器官調節作用などに関与していることから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の進行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚異常、視覚異常などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

- 15 本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAを上記の医薬として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る溶媒との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

25 本発明のDNAを用いる場合は、該DNAを単独またはレトロウイルスベク

ター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチエリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

- 15 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

- また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無菌化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調剤された注射液は通常、適当なアンブルに充填される。

1~100程度、さらに好ましくは(1または2個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども含まれる。

5 配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有する本発明のポリペプチドの前駆体タンパク質として、具体的には、配列番号：18または配列番号：19で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられ。

配列番号：21で表されるアミノ酸配列を含有する本発明のポリペプチドの前駆体タンパク質として、具体的には、配列番号：29で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

10 本明細書における前駆体タンパク質はペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。例えば、配列番号：18、配列番号：19または配列番号：29で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列などを含有する本発明の前駆体タンパク質はC末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO⁻)であるが、C末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₄アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₆シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキルなどのC₇₋₁₄アラキル基のほか、縫口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチル基などがあげられる。

本発明の前駆体タンパク質の塩としては、例えば、上記の本発明のポリペプチドの塩として例示したものと同様のものなどがあげられる。

25 本発明の前駆体タンパク質は、上述の本発明のポリペプチドの製造法に準じて、ヒトや温血動物の組織または細胞からタンパク質を精製する方法によって

製造することもできるし、タンパク質合成法に準じて製造することもできる。また、上述の本発明のポリペプチドの製造法に準じて、本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

5 ヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸、有機溶媒などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてることにより精製分離することができる。

10 本発明の前駆体タンパク質のアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、上記のペプチド合成用樹脂などが用いられる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の本発明の前駆体タンパク質を取得する。

本発明の前駆体タンパク質としては、上記した配列番号：18、配列番号：19または配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、該本発明のポリペプチド質と同様の作用、例えば中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用または感覚器官機能調節作用などを前駆体タンパク質自身が有しているものであってもよい。

本発明の前駆体タンパク質はさらに該前駆体タンパク質に対する抗体の調製のための抗原として用いることができる。このような抗原としてのタンパク質は上記した本発明の前駆体タンパク質の他に、上記本発明の前駆体タンパク質

のN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドなどが用いられる。

部分ペプチドとしては、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

5 本発明の前駆体タンパク質の部分ペプチドの塩としては、前述の前駆体タンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明の前駆体タンパク質の部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、上記した前駆体タンパク質の場合と同様の合成法に従って、あるいは本発明の前駆体タンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

10 本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：18、配列番号：19または配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記した組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

20 ここで、配列番号：18、配列番号：19または配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：30で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる他、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：30で表される塩基配列と約50

%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

5 また、配列番号：18、配列番号：19または配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、①配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：30で表される塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは（1または2個）の塩基が欠失した塩基配列、②配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：30で表される塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは（1または2個）の塩基が付加した塩基配列、③配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：30で表される塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは（1または2個）の塩基が1～30個程度、挿入された塩基配列、④配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：30で表される塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは（1または2個）の塩基が1～30個程度、置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを含み合わせた塩基配列を有するDNAを含有するDNAなども含まれる。

より具体的には、(1)ストリンジェントな条件下で配列番号：18、配列番号：19または配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズする哺乳動物由来のDNA、(2)遺伝コードの塩基のため配列番号：18、配列番号：19または配列番号：29で表され

るアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列および(i)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつタンパク質をコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジエントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl、10mM NaH₂PO₄・H₂O、1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1%SDSである。

配列番号：18、配列番号：19または配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：30で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

また、本発明の配列番号：18、配列番号：19または配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を含有するDNA断片はDNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAは上記した本発明のポリペプチドと同様に遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAまたは本発明の前駆体タンパク質は、①本発明の前駆体タンパク質（または本発明のポリペプチド）の有する生型作用の探索、②合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、③本発明のポリペプチドをコードするDNAの入手、④組換え型レセプタータンパク質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と

医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤抗体および抗血清の入手、⑥DNA、RNA、抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、⑦中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤、感覚器機能調節剤などの医薬の開発、⑧遺伝子治療等に用いることができる。

特に、後述の組換え型SENRの発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なSENRアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

さらに、上記⑦に関し、本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAは中枢神経系、循環器系、心臓、腎臓、泌尿器系または感覚器系などで発現しているSENRがリガンドとして認識するものであるので、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覚器調節作用などに関与していることから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、健忘、嗅覚異常、視覚異常などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、必要に応じて錠衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる相体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた

製剤に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、上記の添加剤と同様のものなどを用いることができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルニコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい、調製された注射液は通常、適当なアンブルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人の心不全患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 から 100 mg、好ましくは

約 1.0 から 50 mg、より好ましくは約 1.0 から 20 mg である。非経口

的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の心不全患者（体重 60 kg として）への投与においては、一日につき約 0.1 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 から 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

本発明における SE-NR としては、上記のとおり、Tal. M. et al., Biochem Biophys. Res. Commun., 209, 732-759, 1995 に記載のもの、Marchese, A., Genomics, 29, 335-344, 1995 に記載のもの、EP 859052 号に記載のものがあげられるのみならず、配列番号：9 または配列番号：26 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする SE-NR またはその塩、または、配列番号：9 または配列番号：26 で表されるアミノ酸配列中の 1 個以上 30 個以下、好ましくは 1 個以上 10 個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：9 または配列番号：26 で表されるアミノ酸配列に 1 個以上 30 個以下、好ましくは 1 個以上 10 個以下のアミノ酸が付加した（または挿入された）アミノ酸配列、あるいは配列番号：9 または配列番号：26 で表されるアミノ酸配列中の 1 個以上 30 個以下、好ましくは 1 個以上 10 個以下、好ましくは 1 個以上 10 個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である SE-NR またはその塩などがあげられる。

また、本発明で用いられる SE-NR の部分ペプチドは前記した本発明の SE-NR の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明の SE-NR 蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、本発明のポリペプチドとの結合活性を有するものなどが用いられる。

これら本発明で用いられるSENRRまたはその部分ペプチドは、Tal. M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 752-759, 1995に記載の方法、Marchese, A., Genomics, 29, 335-344, 1995に記載の方法、EP 859052号に記載の方法と同一またはそれらに準じた方法によって製造することができる。

5 上述の本発明のポリペプチドと同様の方法によっても製造することができる。

また、本発明で用いられるSENRRまたはその部分ペプチドの塩としては、上記の本発明のポリペプチドと同様のものなどがあげられる。

本発明で用いられるSENRRまたはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記のSENRRまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記した組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画분을調整したものをを用いて直接RT-PCR法によって増幅することもできる。本発明で用いられるSENRRまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、

Tal. M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 752-759, 1995に記載の方法、Marchese, A., Genomics, 29, 335-344, 1995に記載の方法、EP 859052号に記載の方法と同一またはそれらに準じた方法によって得ることもできる。

20 本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質、該ポリペプチドまたは前駆体タンパク質をコードするDNAおよび抗体などの用途について、以下に具体的に説明する。

(1) ポリペプチド欠乏症の予防・治療剤

SENRRに対する本発明のポリペプチドおよびその前駆体タンパク質が有する作用に応じて、本発明のポリペプチドをコードするDNAをポリペプチドまたはSENRR欠乏症の予防・治療剤としても使用することができる。

例えば、生体内において、本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはSENRRが減少しているためにリガンドの生理作用（中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覚器官機能調節作用など）が期待できない患者がいる場合に

、（イ）本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）脳細胞などに本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、脳細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の脳細胞におけるポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の量を増加させ、ポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の作用を充分に発現させることができる。したがって、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質をコードするDNAは、安全で低毒性なポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。

上記DNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質もしくはそれらの部分ペプチドをコードするDNAを医薬として使用する場合と同様の手段に従って実施することができ。

(2) ポリペプチドに対するSENRRの定量法

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質はSENRまたはその塩やその部分ペプチドまたはその塩に対して結合性を有しているので、生体内におけるSENRもしくはその塩、または該SENRの部分ペプチドまたはその塩の濃度を感度良く定量することができる。

5 この定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と接触させることによって被検体中のSENRもしくはその塩、またはSENRの部分ペプチドもしくはその塩の濃度を測定することができる。

具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の自体公知の方法あるいは10 はそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「放射ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

(3) SENRと、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質(以下、リガンドまたはポリペプチドと略称する場合がある。)との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法

SENRまたはその塩やその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組織換え型SENRの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、SENRを介して細胞刺激活性

(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位

変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(即ちSENRアゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(即ちSENRアntagゴニスト)などが含まれる。「リガンドとの結合性を变化させる」とは、リガンドとの結合を阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

上記スクリーニング方法においては、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質として、上記のものに加えて、配列番号:22で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、およびその前駆体タンパク質またはその塩、およびその前駆体タンパク質またはその塩が用いられる。

配列番号:22で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、およびその前駆体タンパク質またはその塩は上記の本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、およびその前駆体タンパク質またはその塩と同等の方法によって製造することができる。

また、配列番号:22で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、その前駆体タンパク質をコードするDNAは、上記の配列番号:22で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、その前駆体タンパク質をコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、前記した組織・細胞由来のcDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいづれであってよい。また、前記した組織・細胞より

RNA 画分を調整したものをを用いて直接 RT-PCR 法によって増幅すること
もできる。本発明で用いられる配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有
するポリペプチド、その前駆体タンパク質をコードする DNA は、上記の本発
明のポリペプチド、その前駆体タンパク質をコードする DNA と同様の方法に

5 より得ることができる。

以下、SENR と本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質との結
合性を変化させる化合物のスクリーニング方法の説明においては、「本発明の
ポリペプチド」は、上記の「本発明のポリペプチド」および「配列番号：22
で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド」を意味し、「本発明のポリ
ペプチドの前駆体」は、上記の「本発明のポリペプチドの前駆体」および「配
列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドの前駆体」を意
味する。

さらに、以下、SENR と本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク
質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法の説明においては、「
15 本発明のポリペプチドをコードする DNA」および「配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする DNA」を意味し、「本発明のポリペプチドをコードする DNA」および「配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする DNA」は、上記の「本発明のポリペプチドの前駆体をコードする DNA」および「配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドの前駆体をコードする DNA」を意味する。

すなわち、本発明は、(i) SENR もしくはその塩または該 SENR の部
分ペプチドもしくはその塩に、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タン
20 ク質を接触させた場合と (ii) 上記した SENR もしくはその塩または該 SENR

NR の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のポリペプチドまたはその前駆
体タンパク質および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴
とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と上記した SENR
との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する

5 .

本発明のスクリーニング方法においては、(i) 上記した SENR または該
SENR の部分ペプチドに、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク
質を接触させた場合と (ii) 上記した SENR または該 SENR の部分ペプチ
ドに、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物を
10 接触させた場合における、例えば該 SENR または該 SENR の部分ペプチド
に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

本発明のスクリーニング方法は具体的には、

① 標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を、上記した S
ENR もしくはその塩または SENR の部分ペプチドまたはその塩に接触させ
15 た場合と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および
試験化合物を SENR もしくはその塩または SENR の部分ペプチドもしくは
その塩に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその
前駆体タンパク質の該 SENR もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくは
はその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペ
20 プチドまたはその前駆体タンパク質と SENR との結合性を変化させる化合物
またはその塩のスクリーニング方法、

② 標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を、SENR を
含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明のポリ

リペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物をSENRを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

③標識した本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質を、SENRをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSENRに接触させた場合と、標識した本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物をSENRをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSENRに接触させた場合における、標識した本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質のSENRに対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

④SENRを活性化する化合物（例えば、本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質）をSENRを含有する細胞に接触させた場合と、SENRを活性化する化合物および試験化合物をSENRを含有する細胞に接触させた場合における、SENRを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸遊離、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

スクリーニング方法、および

⑤SENRを活性化する化合物（例えば、本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質など）をSENRをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSENRに接触させた場合と、SENRを活性化する化合物および試験化合物を、SENRをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSENRに接触させた場合における、SENRを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸遊離、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などである。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるSENRとしては、上記のSENRまたはSENRの部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたSENRなどが適している。

SENRを製造するには、前述の方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、SENRを含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

SENRを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

SENRを含有する細胞としては、SENRを発現した宿主細胞というが、

該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分をいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica社製)による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の画分には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速(500rpm〜3000rpm)で短時間(通常、約1分〜10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm〜30000rpm)で通常30分〜2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したSENRと細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

該SENRを含有する細胞や膜画分中のSENRの量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を變化させる化合物をスクリーニングする前記の①〜③を実施するためには、適当なSENR画分と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が用いられる。SENR画分としては、天然型のSENR画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型SENR画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアログ化合物などが用いられる。例えば ^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{35}S などで標識されたリガンドな

どを利用することができる。

具体的には、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を變化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずSENRを含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4〜10(望ましくはpH6〜8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM(花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターや本発明のポリペプチドの分解を抑える目的でPMSEF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml〜10mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm〜500000cpm)の標識した本発明のポリペプチドを添加し、同時に $10^{-10} \sim 10^{-7}$ Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の本発明のポリペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンタまたはγ-カウンタで計測する。結核する物質がない場合のカウント(B₀)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B₀-NSB)を100%とした時、特異的結合量(B-NSB)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を變化させる化合物をスクリーニングする前記の④〜⑤の方法を実施するために

は、SEN Rを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca³⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、SEN Rを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。

スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができ

15 ける。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なSEN Rを発現した細胞が必要である。本発明のSEN Rを発現した細胞としては、前述の組織型SEN R発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSEN Rとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、SEN Rまたはその塩、SEN Rの部分ペプチドまたはその塩、SEN Rを含有する細胞、あるいはSEN Rを含有する細胞の膜画分、および本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45μmのフィルターで過ろ滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②SEN R標品

SEN Rを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁵個/穴で接種し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

(³H)、(¹²⁵I)、(¹⁴C)、(³⁵S) などで標識したリガンド

適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

④リガンド標準液

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

①12穴細胞培養用プレートにて培養したSEN Rを発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②10⁻³~10⁻¹⁰Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識した本発明のペプチドまたはその前駆体タンパク質を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに10⁻³Mのリガンドを5μl加えておく。

③反松液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンタ（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$\text{式} \quad \text{PMB} = \left[\frac{(B - \text{NSB})}{(B_0 - \text{NSB})} \right] \times 100$$

PMB: Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物であり、具体的にはSENRを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるSENRアゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆるSENRアンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記SENRアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の（i）または（ii）に従えばよい。

（i）前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記したSENRを介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はSENRアゴニストであり、該活性を有し

ない化合物またはその塩はSENRアンタゴニストである。

（ii）（a）試験化合物をSENRを含有する細胞に接触させ、上記SENRを介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はSENRアゴニストである。

（b）SENRを活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはSENRアゴニストなど）をSENRを含有する細胞に接触させた場合と、SENRを活性化する化合物および試験化合物をSENRを含有する細胞に接触させた場合における、SENRを介した細胞刺激活性を測定し、比較する。SENRを活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させる化合物またはその塩はSENRアンタゴニストである。

該SENRアゴニストは、SENRに対する本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が有する生理活性と同様の作用を有しているため、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、SENRアンタゴニストは、SENRに対する本発明のポリペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質は中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覚器官調節作用などに関与していることから、SENRアゴニストは、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、嚔嚔、嗅覚異常、視覚異常などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる

化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ピリジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどの塩があげられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えば辛酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ペンゼンスルホン酸、安息香酸などの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬として使用する場合、上記の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を医薬として実施する場合と同様にして製剤化・投与することができる。

(4) 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体または抗血清の製造

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のポリペ

プチドまたはその前駆体タンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

例えば、ポリクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

5 【ポリクローナル抗体の作製】

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド等抗原）とキャリアータンパク質との複合体をつくり、後述のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物（例えば、哺乳動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテン（本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチド）との割合は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものを適当な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンベット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～2.0、好ましくは約1～5の割合でカプセルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の結合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、上記温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あ

るいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

5 ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取される。

抗血清中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体価の測定は、後述のハイブリドーマ培養上清の抗体価の測定と同様にして測定できる。抗体の分離精製は、後述のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

また、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

(モノクローナル抗体の作製)

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質は、温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された上記の温血動物、たとえばマウスなどから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化した本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはそれらの部分ペプチド

と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法（ネイチャー（Nature）、256、495（1975））等に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

5 骨髓細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえば本発明のポリペプチド抗原またはその前駆体タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロープレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添

25 加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のポリペプチドを加え、固相に結合した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動

物細胞培養地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の本発明のポリペプチドに対する抗体価の測定と同様にして測定される。

(b) モノクローナル抗体の精製

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法（例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行われる。

上記の（a）および（b）の方法に従って製造させる本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体は、それぞれ本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、例えば、

(1) 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に反応する抗体と、被検液および標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と

を競合的に反応させ、該抗体に結合した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量法、

(ii) 被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定すること、を特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量法において、一方の抗体が、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質のN末端を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質のC末端に反応する抗体であることを特徴とする被検液

中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量法を提供する。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を認識するモノクローナル抗体を用いて本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、

あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原質（例えばポリペプチド）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などがあげられる。放射性同位元素としては、例えば¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなどが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えばβ-ガラクトシダーゼ、β-グルコ

シダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンインゾチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれあげられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

5 抗原あるいは抗体の不溶性に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶性、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

10 サンドイッチ法においては不溶性した抗ポリペプチド抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗ポリペプチド抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶性担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、

15 また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。
標識化剤および不溶性の方法は前記のそれに準じて行うことができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

20 本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗ポリペプチドまたはその前駆体タンパク質抗体は本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、
25 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質のC末端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC末端部以外、例えばN末端部を

認識する抗体が用いられる。

5 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロトリーなどを用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識フロモトリーに対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（F）と抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

20 これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはそれらの部分ペプチドの測定系を構築すればよい。

25 これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる（例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49

- 年発行)、入江 寛編「脱ラジオアイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunological Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunological Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunological Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunological Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunological Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunological Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照。

以上のように、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を感度良く定量することができる。

- 15 被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を定量することによって、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が関与する疾患を診断することができる。本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が関与する疾患としては、例えば、老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の進行変成疾患(例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ビック病、ハンチントン病など)に起因する痴呆、高(低)血圧症、腎疾患(例：慢性腎不全、腎炎など)、心疾患(例：心不全、急性心筋梗塞など)、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚異常、視覚異常などの疾病があげられる。被検液は被検哺乳動物(例、ヒト、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ)から自他公知の方法によって調製できる。被検液としては、例えば、血液
- 20 リンパ液、尿などがあげられる。
- 25 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用語号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に關し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

5	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
10	C	: シトシン
	Y	: チミンまたはシトシン
	N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
	R	: アデニンまたはグアニン
	M	: シトシンまたはアデニン
15	W	: チミンまたはアデニン
	S	: シトシンまたはグアニン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
20	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
25	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	TFA	: トリフルオロ酢酸

E I A : エンザイムイムノアッセイ

G l y または G : グリシン

A l a または A : アラニン

V a l または V : バリン

L e u または L : ロイシン

I l e または I : イソロイシン

S e r または S : セリン

T h r または T : スレオニン

C y s または C : システイン

M e t または M : メチオニン

G l u または E : グルタミン酸

A s p または D : アスパラギン酸

L y s または K : リジン

A r g または R : アルギニン

H i s または H : ヒスチジン

P h e または F : フェニルアラニン

T y r または Y : チロシン

T r p または W : トリプトファン

P r o または P : プロリン

A s n または N : アスパラギン

G l n または Q : グルタミン

p G l u : ピログルタミン酸

M e : メチル基

E t : エチル基

B u : ブチル基

P h : フェニル基

T C : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

B o m : ベンジルオキシメチル

N M P : N-メチルピロリドン

P A M : フェニルアセトアミドメチル

5 また、本明細書中で採用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

T o s : p-トルエンシルフオニル

H O N B : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキサミド

10 B z l : ベンジル

Z : ベンジルオキシカルボニル

B r - Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル

C l - Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル

B o c : t-ブチルオキシカルボニル

15 H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

D C C : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

T F A : トリフルオロ酢酸

F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル

D N P : ジニトロフェニル

20 B u m : ターシャリーブトキシメチル

T r t : トリチル

M e B z l : 4-メチルベンジル

C H O : ホルミル

N M P : N-メチルピロリドン

25 O c H e x : シクロヘキシルエステル

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

(配列番号：1)

ラットSENRタンパク質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

(配列番号：2)

ラットSENRタンパク質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

(配列番号：3)

5'側に制限酵素Sal Iの認識する塩基配列が付加され、また3'側に制限酵素Spc Iの認識する塩基配列が付加されたラットSENRタンパク質cDNAの全塩基配列を示す。

(配列番号：4)

SENR発現CHO細胞株の各クローンにおけるSENRレセプタータンパク質mRNAの発現量を測定するために使用したriboprobeを示す。

(配列番号：5)

ブタ脊髄から精製されたSENRに対するリガンドペプチドのN末端アミノ酸配列解析の結果から得られたアミノ酸配列を示す。

(配列番号：6)

ブタ脊髄から精製されたSENRに対するリガンドペプチドのN末端アミノ酸配列解析の結果から得られたアミノ酸配列を示す。

(配列番号：7)

ブタ脊髄から精製されたSENRに対するリガンドペプチドのN末端アミノ酸配列解析の結果から決定されたアミノ酸配列を示す。

(配列番号：8)

ブタ脊髄から精製されたSENRに対するリガンドペプチドのN末端アミノ酸配列解析の結果から決定されたアミノ酸配列を示す。

(配列番号：9)

実施例2で確認されたラットSENRタンパク質のアミノ酸配列を示す。

(配列番号：10)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの部分配列を取得するのに使用した合成DNAを示す。

(配列番号：11)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの部分配列を取得するのに使用した合成DNAを示す。

(配列番号：12)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質の一部をコードするcDNAの塩基配列を示す。

(配列番号：13)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAプローブを示す。

(配列番号：14)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAプローブを示す。

(配列番号：15)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質cDNAの全塩基配列を示す。

(配列番号：16)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質cDNAの全塩基配列を示す。

(配列番号：17)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質cDNAの全塩基配列を示す。

(配列番号：18)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質の全アミノ酸配列を示す。

(配列番号：19)

ブタSENRリガンド前駆体タンパク質の全アミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 20)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質の一部をコードするcDNAの塩基配列を示す。

(配列番号 : 21)

ウシSENRリガンドペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 22)

ヒトSENRリガンドポリペプチド (ヒトurotensin II) のアミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 23)

ヒトSENRタンパク質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

(配列番号 : 24)

ヒトSENRタンパク質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

(配列番号 : 25)

5'側に制限酵素Sal Iの認識する塩基配列が付加され、また3'側に制限酵素Spe Iの認識する塩基配列が付加されたヒトSENRタンパク質cDNAの全塩基配列を示す。

(配列番号 : 26)

実施例20で確認されたヒトSENRタンパク質の全アミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 27)

配列番号 : 8 (ブタリガンド2) のDNA配列を示す。

(配列番号 : 28)

配列番号 : 21 (ウシリガンド) のDNA配列を示す。

(配列番号 : 29)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質の全アミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 30)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質cDNAの全塩基配列を示す。

(配列番号 : 31)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'側部分配列を取得するためのRACE-PCRに使用した合成DNAを示す。

(配列番号 : 32)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'側部分配列を取得するためのRACE-PCRに使用した合成DNAを示す。

(配列番号 : 33)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'側部分配列の塩基配列を示す。

(配列番号 : 34)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'側部分配列を取得するためのRACE-PCRに使用した合成DNAを示す。

(配列番号 : 35)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'側部分配列を取得するためのRACE-PCRに使用した合成DNAを示す。

(配列番号 : 36)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'側部分配列の塩基配列を示す。

(配列番号 : 37)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの全長配列を取得するために使用した合成DNAを示す。

(配列番号 : 38)

ウシSENRリガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの全長配列を取得するために使用した合成DNAを示す。

(配列番号：39)

SENRリガンドポリペプチドのC末端側を認識する抗体を作製するための抗原として使用したハゼウロニンIIペプチドのアミノ酸配列を示す。

5 後述の実施例10で得られた配列番号：15で表される塩基配列を含有する形質転換体 *Escherichia coli* XL1 Blue/pZ1-puro2 は、1999年8月23日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERMBP-6858として、財団法人発酵研究所 (IFO) に1999年3月18日から寄託番号 IFO 16271として寄託されている。

10 後述の実施例10で得られた配列番号：17で表される塩基配列を含有する形質転換体 *Escherichia coli* XL1 Blue/pZ1-puro5 は、1999年8月23日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERMBP-6859として、財団法人発酵研究所 (IFO) に1999年3月18日から寄託番号 IFO 16272として寄託されている。

15 後述の実施例10で得られた配列番号：16で表される塩基配列を含有する形質転換体 *Escherichia coli* XL1 Blue/pZ1-puro9 は、1999年8月23日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERMBP-6860として、財団法人発酵研究所 (IFO) に1999年3月18日から寄託番号 IFO 16273として寄託されている。

20 後述の実施例36で得られた配列番号：36で表される塩基配列を含有する形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/pCR-buro1は、1999年11月8日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERMBP-6932として、財団法人発酵研究所 (IFO) に1999年10月27日から寄託番号 IFO 16332として寄託されている。

25

実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1 ラット胎由来cDNAを用いたPCR法によるラットSENR (=GPR14) 受容体cDNAの増幅

5 ラット胎由来poly (A)⁺RNA (クローンテック社) を鋳型とし、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写反応は、タカラRNA PCR ver. 2キットの試薬を使用した。次にこの逆転写生成物を鋳型として用い、配列番号：1および2の合成DNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。合成DNAプライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構

10 築したが、その際に遺伝子の5'側に制限酵素Sal Iの認識する塩基配列が付加され、また3'側に制限酵素Spe Iの認識する塩基配列が付加されるように、5'側および3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、cDNA鋳型5 ml、合成DNAプライマー各1 μM、0.2 mM dNTPs、1 mM MgCl₂、KOD (King of DNA) DNAポリメラーゼ1 μlおよび酵素に付属のバッファで、総反応量は50

15 μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を用い、94℃・60秒の加熱の後、94℃・30秒、59℃・30秒、74℃・60秒のサイクルを35回繰り返した。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

20 実施例2 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による増幅cDNA配列の確認

実施例1で行なったPCR後の反応産物は0.8%の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分をカミソリで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なってDNAを回収した。PCR-ScriptTM Amp SK (+) クローニングキット (ストラタジーン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR-Script Amp SK (+) ヘサブクローニン

グした。これをエシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体 *E. coli* JM109/SENRを得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIA prep8 mini prep (キアゲン社) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いて制限酵素Sal IおよびSpe Iによる切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた3クローンの配列を解析し全ての配列が報告されているSENR (sensory epithelial neuropeptide-like receptor) のDNA配列 (Tal, M. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 209, pp. 752-759 (1995)) の5'側にSal I認識配列が付加し、3'側にSpe I認識配列が付加した遺伝子配列と一致することを確認した (図1および配列番号: 3)。なお、報告されているGPR14遺伝子の配列 (Marchese, A. et al. Genomics, vol. 29, pp. 335-344 (1995)) では開始コドンであるATGのAを1番目としたとき945番目がGであるが、SENRの配列および上記で決定した配列ではCである。

実施例3 SENR発現CHO細胞の作製

実施例2で配列が確認されたラット脳由来のSENRの全長アミノ酸配列をコードし5'側にSal I認識配列が付加し、また3'側にSpe I認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換された *E. coli* のクローンより Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素Sal IおよびSpe Iで切断してインサート部分を切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって回収した。この

インサートDNAをSal IおよびSpe Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKKO-111H (Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1219, pp. 251-259 (1994) 記載のpAKKO1.11Hと同一のベクタープラスミド) に加え、T4ライゲース (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミドpAKKO-SENRを構築した。

pAKKO-SENRで形質転換した *E. coli* DH5 (トーマヨーバー) を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いてpAKKO-SENRのプラスミドDNAを調製した。これをCellPect Transfection Kit (アマシヤムファルマシアバイオテック社) を用い添付のプロトコルに従ってCHO dhfr細胞に導入した。10 μ gのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に 5×10^4 または 1×10^5 個のCHO dhfr細胞を播種した10 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核糖不含MEM α 培地で培養した。選択培地中で増殖してくるSENR発現CHO細胞である形質転換細胞のコロニー88クローンを選択した。

15

実施例4 全長SENRレセプタータンパク質mRNAの発現量の高いCHO/SENR細胞株の選択

実施例3で樹立されたCHO/SENR株88クローンの全長SENRレセプタータンパク質mRNAの発現量をCytostar T Plate (アマシヤムファルマシアバイオテック社) を用い、添付のプロトコルに従って以下のように測定した。CHO/SENR株の各クローンをCytostar T Plateの各wellに 2.5×10^4 個ずつ播種して24時間培養した後、10%ホルマリンによって細胞を固定した。各wellに0.25% Triton X-100を添加して細胞の透過性をあげた後、 32 Sラベルした配列番号: 4のriboprobeを加えてハイブリダイズさせた。20 mg/mlのRNaseAを各wellに加えて遊離のriboprobeを消化し、プレートをよく洗浄した後、ハイブリダイズしたriboprobeの放射活性をTopcounterで測定した。放射活性の高い株がmRNA発現量が高い。

25

mRNA発現量の高いクローン (#36および61) を以下の実験に用いたが、特にクローン番号61を主に用いた。

実施例5 プタ腎臓抽出物に含まれ、CHO/SENR細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性の検出

5 プタ腎臓抽出物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) フラク션을以下に述べる方法で調製した。東京芝浦薬機所より購入した、処理当日に廃殺して抽出後は氷冷保存したブタ腎臓350 g (10頭分) を細かく切断し、直ぐに沸騰した蒸留水1.4 lに投じて10分間煮沸した。煮沸後、直ちに氷冷し、84 mlの酢酸を加えて終濃度1.0 Mとし、ポトリロン (30,000 rpm, 6分間) を用いて破砕した。破砕液を遠心 (8,000 rpm, 30分) して上清を取り、沈殿には1.0 M酢酸1.4 lを加えて再度ポトリロンによって破砕し、一晩攪拌した後、遠心 (8,000 rpm, 30分) して上清を得た。上清に2倍量の冷アセトンを4℃でゆっくり滴下した後、1回目の遠心によって得た上清については一晩攪拌し、2回目の遠心によって得た上清については4時間攪拌した。アセトンを加えた抽出液は遠心 (8,000 rpm, 30分) して沈殿を除き、得られた上清からエバポレーターによって減圧化にアセトンを溜去した。アセトンを除いた抽出液に等量のジエチルエーテルを加え、分液ロートを使って脂質を含むエーテル層を分離して水層を回収した。エーテル脱脂した抽出液はエバポレーターによって減圧化に濃縮してエーテルを完全に除去した。濃縮液をガラス繊維濾紙 (アドバンテック、DP70 (90 mmφ)) で濾過し、濾液をガラス製カラム (20φ x 240 mm) に充填したC18 (ワ

15 イエムシー、YMCgel ODS-AM 120-S50) カラムに添加した。カラムを1.0 M酢酸300 mlで洗浄後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリル300 mlで溶出した。溶出液を減圧化に濃縮して溶媒を溜去した後、濃縮液を凍結乾燥した。凍結乾燥品約0.2 gを14 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルに溶解し、7 mlずつをC18カラム (トーマソー、TSKgel ODS-80TM (21.5φ x 300

20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

mm)) を用いた10%から60%の0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配溶出法によるHPLCにかけた。HPLCは2回行なった。溶出液は60分間に分取し、2回分の溶出液をまとめた。各分画を減圧化に濃縮・乾固し、残渣を0.35 mlのジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解した。

5 CHO/SENR細胞およびmock CHO細胞を24穴プレートに5 x 10⁴ cell/wellで播種し、24時間培養後、[³H]アラキドン酸を0.25 μCi/wellとなるよう添加した。[³H]アラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05% ウシ血清アルブミン (BSA) を含むハンクス試液 (HBSS) で洗浄し、各wellに上述のHPLC分画のDMSO溶液2 μl (等量2 μl相当) を加えた0.05% BSA含有HBSS 500 μlを添加した。37℃で30分間インキュベートした後に、反応液500 μlから350 μlをシンチレーターに加え、反応中に遊離された[³H]アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンタ

10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

実施例6 プタ腎臓抽出物中のSENR発現CHO細胞に対して特異的にアラキドン酸代謝物遊離活性を示す活性物質のプロナーゼによる失活

25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

) で処理し、活性物質が蛋白性であるかを調べた。

- 上記脊髄抽出物HPLC分画 (433) 4 μ l を0.2 M酢酸アンモニウム200 μ l に加え、これにプロナールゼ3 μ g を添加して37°Cで2時間インキュベートした後、沸騰水中で10分間加熱してプロナールゼを失活させた。これにBSA 0.05mgおよびCHAPS 0.05 mgを含む蒸留水2 mlを加えてから凍結乾燥した。プロナールゼそのものあるいは加熱および凍結乾燥の影響を調べるため、プロナールゼのみ、HPLC分画のみおよびプロナールゼのみを加熱処理した後にHPLC分画を加えたものについても同様に処理して凍結乾燥した。凍結乾燥した各試料を0.05% BSA含有HBSS 500 μ l に溶解し、実施例5に示す方法によってCHO/SENR細胞に添加してアラキドン酸代謝物遊離活性を測定した。結果を図3に示した。活性は0.05% BSA含有HBSS 500 μ l を加えたwellのアラキドン酸代謝物遊離量に対する百分率で示した。ブタ脊髄抽出中のCHO/SENR細胞に対するアラキドン酸代謝物遊離活性を示す活性物質はプロナールゼによって完全に失活したことからこの物質が蛋白もしくはペプチドであることが示された。

15

実施例7 ブタ脊髄からのSENR発現CHO細胞に対して特異的にアラキドン酸代謝物遊離活性を示す活性物質の精製

- CHO/SENR細胞に対して特異的にアラキドン酸代謝物遊離活性を示す活性物質をブタ脊髄から精製した代表例を以下に具体的に述べる。東京芝浦製薬(株)より購入した、処理当日に屠殺して抽出後は氷冷保存したブタ脊髄1.0 kg (50頭分) を40 ml塩酸および1.0 M酢酸を含む70%アセトン10 l中でポリトロン (20,000 rpm, 10分間) を用いて破砕した。破砕液を遠心 (8,000 rpm, 30分) して上清を取り、沈殿には再度40 ml塩酸および1.0 M酢酸を含む70%アセトン10 lを加えてポリトロンによって破砕し、一晚攪拌した後、遠心 (8,000 rpm, 30分) して上清を得た。上清をまとめ、エバポレーターによって減圧化してアセトンを溜去した。アセトンを除いた抽出液に等量のジエチルエーテルを加え、分液ロー

トを使って脂質を含むエーテル層を分離して水層を回収した。エーテル脱脂した抽出液はエバポレーターによって減圧化に濃縮してエーテルを完全に除去した。濃縮液をガラス繊維濾紙 (アドバンテック、DP70 (90 mmφ)) で濾過し、濾液の半量をガラス製カラム (30 ϕ x 240 mm) に充填したC18 (ワイエムシー、YMCgel ODS-AM 120-S50) カラムに添加した。カラムを1.0 M酢酸400 mlで洗浄後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリル500 mlで溶出した。溶出液を減圧化に濃縮して溶媒を溜去した後、濃縮液を凍結乾燥した。残りの半量についても同様に処理し、凍結乾燥した。合計約1.9 gの凍結乾燥品を60 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルに溶解し、10 mlずつをC18

- 10 カラム (トーション、TSKgel ODS-80T; (21.5 ϕ x 300 mm)) を用いた10%から60%の0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配溶出法によるHPLCにかけた。HPLCは6回行ない、溶出液は60分面に分取して6回分をまとめた。各分画について実施例5に示す方法によってSENR発現CHO細胞に添加してアラキドン酸代謝物遊離活性を測定した。活性は分画131および132に認められた。
- 15 これらの分画131 (①) および132 (②) を別々に以下に示すような同一の工程で精製した。それぞれの活性分画を減圧化に濃縮して溶媒を除いた後、凍結乾燥した。これを10%アセトニトリルを含む10 ml酢酸アンモニウム10 mlに溶解し、陽イオン交換カラム (トーション、TSKgel SP-5PW (20 mm ϕ x 150 mm)) に添加した後、10%アセトニトリルを含む10 mlから300 mlの酢酸アンモニウムの濃度勾配によってカラムを溶出した。①および②のいずれについても活性は酢酸アンモニウム140 ml付近に回収された。活性分画を凍結乾燥し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル1.0 mlに溶解し、0.5 mlずつをジフエニルカラム (セパレーショングループ、Vydac 219-TP54) に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む26%から31%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。HPLCは2回行ない、溶出液は2回分をまとめて分取した。活性は①がアセトニトリル27.1%付近、②が27.6%付近に出現した。それぞれの活性分画を

25

凍結乾燥し、0.1 mlのDMSOで溶解し、さらに0.4 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルを加えてCNカラム（野村化学、Develosil CN-UG-5）に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む28.5%から33.5%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。溶出液はピーク毎に手動で分取した。活性は①がアセトニトリル29.7%付近、②が29.9%付近に溶出された（図4、5）。これらの活性ピークを含む溶出液を蒸留水で約2倍に希釈し、ODSカラム（和光純薬、Wakosil-11 3C18HC）に添加した後、0.1%ヘプタフルオロ酢酸を含む30%から35%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。活性は①がアセトニトリル32.2%付近、②が32.5%付近にそれぞれ単一ピークとして出現した（図6、7）。

実施例8 プタ育種から精製されたSENR発現CHO細胞に対して特異的にアラキドン酸代謝物遊離活性を示す活性物質のアミノ酸配列の決定

実施例7で精製されたCHO/SENR細胞に対して特異的にアラキドン酸代謝物遊離活性を示す活性物質のアミノ酸配列解析を行なった。本活性物質は実施例6に示すように蛋白またはペプチドであることが推定されていたので、活性ピークを含む溶出液を用いてパーキンエルマー社Proclise 494 Protein Sequencerによってアミノ末端アミノ酸配列解析を行なった。その結果、配列番号：5および6に示す配列が得られた。6残基目と11残基目にはアミノ酸が検出されなかった。そこで、活性物質②についてトリプチルフォスフィンと4-ピニルピリジンをを用いて還元/ピリジルエチル化を行なった後、配列解析を行なったところ11残基目には依然としてアミノ酸が検出されなかったが、6残基目はピリジルエチルシステインが検出された。これにより、活性物質②の6残基目および11残基目はシステインであり、これら2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成していることが推定された。類似した構造を有する活性物質①も同様に6残基目および11残基目はシステインであり、これら2つのCys残基は分子内ジスルフィド結

合を形成していることが推定された。以上より、2つの活性物質の推定アミノ酸配列として配列番号：7および8が決定された。

実施例9 PCR法によるプタSENRリガンド前駆体タンパク質の部分配列の取得

5 プタゲノムDNA（クロンテック社）を鋳型にGenBankデータベースに登録されているヒトurotensin II（Coulouarn, Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 95, pp. 15803-15808 (1998)) 前駆体タンパク質の一部をコードする塩基配列（accession No. A4535545）の部分配列である配列番号：10および11のprimerを用いてPCR反応を行なった。反応液の組成は、合成プライマー各1 μM、精製DNA 500 ng、0.2 mM dNTPs、ExTaq DNA polymerase（宝酒造）1.25 unitおよび酵素に付属の緩衝液で総反応液量は20 μlとした。増幅のためのサイクルは、サーマルサイクラー（パーキンエルマー社）を用い、94℃・4分、その後、94℃・30秒、60℃・30秒、72℃・15秒のサイクルを2回、94℃・30秒、55℃・30秒、72℃・15秒のサイクルを4回、94℃・30秒、52.5℃・30秒、72℃・15秒のサイクルを6回、94℃・30秒、50℃・30秒、72℃・15秒のサイクルを30回繰り返した。増幅産物の確認は1.5%アガロース電気泳動及びエチジウムブロマイド染色によって行なった。得られた反応液2 μlをTOPO TA cloning kit（インビトロジェン社）を用いてプラスミドベクターpCR IIへサブクローニングし、大腸菌DH5αへ導入した。生じた形質転換体からQIA prep8 mini prep（キアゲン社）を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit（パーキンエルマー社）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、プタ育種より精製されたSENRリガンドポリペプチドの部分配列を含むプタSENRリガンド前駆体cDNAの一部と考えられる塩基配列（配列番号：12）を得た。この配列をプローブとして実施例10に記載した

、25 たプタ育種cDNAライブラリーのスクリーニングを行なった。

実施例10 プタ菌 cDNAライブラリーから得られたSENRIガンダ前駆体タンパク質全コード領域を含むcDNAの配列決定

プタ菌 cDNAライブラリー (ニッポンジーン社) により total RNA を調製後、Oligoex (dT)₃₀ (宝酒造社) を用いて poly (A)⁺ RNA 画分を調製した。この poly (A)⁺ RNA 2

5 μ g から SuperScript Lambda System for cDNA Synthesis and λ cloning kit (ギブコBRL社) を用い、マニュアルにしたがって λ ZipLox Not I/Sal I Arm に cDNA を導入し、GigaPack III Gold (ストラタジーン社) を用いてパッケージングすることによってプタ菌 cDNAライブラリーを作成した。このうち 1.6×10^6 pfu (plaque forming unit) を大腸菌 Y1090ZL と混合し、37°C で 15 分間インキュベートした後

10 、0.7% アガロース (FMC社) LB を加え、1.5% 寒天 LB プレート 121 枚に蒔いた。プレートにニトロセルロースフィルターを置き、ブラークを転写した。このフィルターをアルカリ処理することで変性させた後、中和、乾燥し、254 nm の紫外線を照射して 80°C で 30 分間加熱することで DNA の固定を行った。このフィルターを 1 mM EDTA、7% SDS および 1% BSA を含む 0.5 M リン酸中で 45°C で 4 時間イン

15 キュベートした後、以下に述べるプロローブと 16 時間インキュベートしてハイブリダイズした。プロローブは、実施例 9 で得られた配列から正鎖として配列番号：13 およびこの配列と一部相補する逆鎖である配列番号：14 を選んで委託合成 (日本バイオサービズ社) した。これらを 70°C で変性させた後、徐々に冷却して互いにハイブリダイズさせ、³²P dCTP (デュポン社) 存在下で Klenow 酵素を用いて放射標識した。さらに、Nick カラム (アマシヤムファーマシアバイオテック社) で精製し、1,000,000 cpm/ml の濃度でハイブリダイズに用いた。洗浄は 0.1% SDS を含む 0.2 x SSC (ニッポンジーン社製 20 x SSC を希釈) 溶液で室温で 4 回、続いて 65°C で 2 回行った。その後、-80°C でオートラジオグラフィを行なう

25 してハイブリダイズするブラークを検出した。このスクリーニングにより 9 個の独立したブラークにハイブリダイゼーションのシグナルが認められた。これらの陽性ブラークから SuperScript Lambda System for cDNA Synthesis and λ

cloning kit (ギブコBRL社) のマニュアルにしたがって in vivo excision 法で目的のプタ SENRI ガンダ前駆体 cDNA を含むプラスミドを切り出し、大腸菌 XL101ue をトランスフォーメーションした。この大腸菌から QIA prep8 mini prep (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応

5 は、DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、プタ SENRI ガンダ前駆体タンパク質の全配列をコードする 3 種類の塩基配列 (配列番号：15、16 および 17) が得られた。配列番号：15 では、翻訳開始コードン ATG の A を 1 番目としたとき 129 番目の塩基が T であり配列番号：16 では C であるが、翻訳された

10 アミノ酸はともに Asp (GAT, GAC) であり同一である。配列番号：17 は、配列番号：15 の、翻訳開始コードン ATG の A を 1 番目とすると 101 番目の C から 208 番目の C ままでが欠失したスプライシングバリエーションであった。対応するアミノ酸配列は、配列番号：15 および 16 に対して配列番号：18、配列番号：17 に対して配列番号：19 である。いずれの前駆体タンパク質もプタ SENRI ガンダ② (配列番号：8) の前駆体であった。図 8 にプタ SENRI ガンダ前駆体の DNA 配列 (配列番号：15) および対応するアミノ酸配列 (配列番号：18) を示す。

実施例 11 PCR 法によるウシ SENRI ガンダ前駆体タンパク質の部分配列の決定

20 ウシゲノム DNA (クロンテック社) を鋳型に、実施例 9 で用いた配列番号：10 および 11 の primer を用いて PCR 反応を行なった。反応液の組成は、合成プライマー各 0.5 μ M、鋳型 DNA 500 ng、0.2 mM dNTPs、2.5 mM MgCl₂、AmpliTaq Gold DNA polymerase (パーキンエルマー社) 0.2 μ l および酵素に付属の緩衝液で総反応液量は 20 μ l とした。増幅のためのサイクルは、サーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を用い、95°C・9 分、94°C・15 秒、60°C・20 秒、72°C・20 秒のサイクルを 2 回、94°C・15 秒、55°C・20 秒、72°C・20 秒のサイクルを 4 回、94°C

・20秒、52.5℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを6回、94℃・20秒、50℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを8回、94℃・30秒、48℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを30回繰り返した後、72℃・5分保温した。増殖産物の確認は1.5%アガロース電気泳動及びエチジウムブロマ이드染色によって行なった。得られた反応液25 μ lをTOP0 TA cloning kit (インビトロジェン社)を用いてプラスミドベクター pcr 2.1へサブクローニングし、大腸菌TOP10へ導入了。生じた形質転換体からQIA prep8 mini prep (キアゲン社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit (パーキンエルマー社)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、PCR産物として、ブタSENRリガンド前駆体の配列と類似することからウシSENRリガンド前駆体の一部であると考えられる配列番号：20が得られた。配列番号：11のプライマーはリガンドペプチドの一部をコードする塩基配列であるが、ブタSENRリガンドのアミノ酸配列と比較することにより、ウシSENRリガンドとして配列番号：21が決定された。

16

実施例 1 2 ブタSENRリガンド①：Gly-Pro-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val (配列番号：7) の製造
市販Boc-Val-OC(CH₃)₃-PM樹脂 (0.77 m mole/g resin) 0.5 m mole 分をペプチド合成機ABI 430Aの反応槽に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法

でBoc-Cys(MeBzl), Boc-Tyr(Bz), Boc-Lys(CI-Z), Boc-Trp(CHO), Boc-Phe, Boc-Cys(MeBzl), Boc-Glu(Ochex), Boc-Ser(Bzl), Boc-Thr(Bzl), Boc-Pro, Boc-Gly, を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂0.59 gをp-クレゾール2.22 g、1,4-ブタンジチオール1.2 mlと共に無水弗化水素10 ml中、0℃・60分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物へジエチルエーテルを加え沈殿を濾過した。この沈殿に50%酢酸水を加え抽出し、不溶部分を除き、抽出液を十分に濃縮後、50%酢酸水で充填したセファデックスG-25 (高

品名) カラム (2.0 x 80 cm)に付し、同溶媒で展開、主要画分を集めLiChrorep (商品名) RP-18を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm)に付け0.1%TFA水 200mlで洗浄、0.1%TFA水 300mlと0.1%TFA含有40%アセトニトリル水 300mlを用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め濃縮した。此れを約4mlの酢酸に溶解し、蒸留水で240mlに希釈の後、アンモニア水を用いpH7.5に調整し、緩やかに空気を吹込み脱脂した。反応をHPLCで追跡し、SHペプチドのピークがすべてSS体に変化した事を確認後、酢酸を加え溶液のpHを3に調整し、上記LiChrorep (商品名) RP-18カラムに吸着した。カラムを0.1%TFA水 200mlで洗浄後、0.1%TFA水 300mlと0.1%TFA含有50%アセトニトリル水 300mlを用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め、凍結乾燥し白色粉末17 mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1417.4 (計算値 1417.6)

HPLC溶出時間 19.0分

カラム条件

16 カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA水、B液-0.1%TFA含有アセトニトリルを用い A/B：95/5→45/55へ直線型濃度勾配溶出 (25分)
流速：1.0 ml / 分

20 実施例 1 3 ブタSENRリガンド②：Gly-Pro-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val (配列番号：8) の製造

実施例12のThrをProに変えて導入し、実施例12と同様に樹脂からの切り出し、SHペプチドの精製、酸化、SSペプチドの精製を行い、白色粉末15 mgを得た。

25 質量分析による (M+H)⁺ 1413.4 (計算値 1413.4)

HPLC溶出時間 19.3分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA水、B液-0.1%TFA含有アセトニトリルを用い A/B :
95/5~45/55へ直線型濃度勾配溶出 (2.5分)

5 流速：1.0 ml / 分

実施例 14 ウシSENRリガンド：Gly-Pro-Pro-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-
Cys-Val (配列番号：21) の製造

実施例12のThrをSerに変えて導入し、実施例12と同様に樹脂からの切り出し
、SHペプチドの精製、酸化、SSペプチドの精製を行った。

質量分析による(MH)⁺ 1403.5(計算値 1403.6)

HPLC溶出時間 1.8、8分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

15 溶離液：A液-0.1% TFA水、B液-0.1%TFA含有アセトニトリルを用い A/B :
95/5~45/55へ直線型濃度勾配溶出 (2.5分)

流速：1.0 ml / 分

実施例 15 ヒトSENRリガンド：Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-
Val (ヒトurotensin II, 配列番号：22) の製造

ヒトSENRリガンド (配列番号：22) はヒトurotensin IIとして報告されてい
る (Coulouarn, Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 95, pp. 15803-15808
(1998)) ペプチドと同一である。

市販Boc-Val- OCH_2 -PAW樹脂 (0.77 mmole/g resin) 0.5 mmole 分を用い実施
例12と同様にBoc-Cys (MeBzl), Boc-Tyr (Br-Z), Boc-Lys (Cl-Z), Boc-Trp (ClO),
Boc-Phe, Boc-Cys (MeBzl), Boc-Asp (OcHex), Boc-Pro, Boc-Thr (Bzl),

Boc-Glu(OcHex)を順に導入した。この樹脂を実施例12と同様に処理し、ペプチ
ドの切り出し、酸化した後精製した。

質量分析による(MH)⁺ 1388.4(計算値 1388.6)

HPLC溶出時間 1.9、0分

5 カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA水、B液-0.1%TFA含有アセトニトリルを用い A/B :
95/5~45/55へ直線型濃度勾配溶出 (2.5分)

流速：1.0 ml / 分

10

実施例 16 合成ブタSENRリガンドペプチドのCHO/SENR細胞株に対するア
ラキドン酸代謝物遊離促進活性

実施例12および13で合成した種々の濃度のSENRリガンドペプチド①および
② (配列番号：7および8) が示すSENR発現CHO細胞に対するアラキドン酸代

15 謝物放出活性を以下の方法により測定した。CHO/SENR細胞を24穴プレートに5 x
10⁴ cell/wellで播種し、24時間培養後、[³H]アラキドン酸を0.25 μ Ci/wellとな
るよう添加した。[³H]アラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05% ウシ血清アルブ
ミン (BSA) を含むハンクス試液 (HBSS) で洗浄し、各wellに種々の濃度の合成

SENRリガンドペプチドを加えた0.05% BSA含有HBSS 500 μ lを添加した。37
℃で30分間インキュベートした後に、反応液500 μ lから350 μ lをシンチレー

20 ターに加え、反応中に遊離された[³H]アラキドン酸代謝物の量をシンチレーショ
ンカウンターにより測定した。その結果、SENRリガンドペプチド①および
② (配列番号：7および8) のいずれについてもペプチドの濃度依存的にアラ

キドン酸代謝物の培地中への放出が確認された。(図9)。なお、活性はパッ
プ

25 アーのみを添加した対照区のアラキドン酸代謝物遊離量に対する百分率で示し
た。また、同様の活性はウシSENRリガンド (配列番号：21) あるいはヒトSENR

リガンD（ヒトurotensin II）（配列番号：22）を使用しても確認された。

実施例1 7 合成ブタSENRリガンDポリペプチドの麻酔下ラットの血圧に対する作用

- 5 実施例12および13で合成した種々の濃度のSENRリガンDポリペプチド①および②（配列番号：7および：8）の麻酔下ラットの血圧に対する作用を以下の方法により測定した。8-9週齢の雄性Wistar rat（日本クレアより購入）をネブタール注射液（大日本製薬、50 mg/ml sodium pentobarbital、50 mg/kg腹腔内投与）により麻酔し、トランスデュースーに接続した血圧測定用カテーテル（SP-55）を左頸動脈に、静脈投与用カテーテル（SP-35）を左大腿静脈にそれぞれ挿入した。合成SENRリガンDは0.05% BSAを含む生理的食塩水に溶解し、1.10. 100 nmol/kgとなるように左大腿静脈より投与した。血圧は連続してポリグラフ（NEC三栄社製）で記録した。ラット血圧は用量依存的に低下し、SENRリガンDポリペプチドはラットに対して降圧作用を示した。ブタSENRリガンD10 nmol/kg投与時のラット血圧（麻酔下）に対する降圧作用を表IIに示す。なお、降圧作用は投与前の平均血圧に対してSENRリガンD投与によって低下した平均血圧の値で示した。また、同様の括弧はウシSENRリガンD（配列番号：21）あるいはヒトSENRリガンD（ヒトurotensin II）（配列番号：22）を使用しても確認された。これらのペプチドの降圧作用を表1に示した。

表1 ラット血圧（麻酔下）に対する合成ブタSENRリガンDポリペプチド、合成ウシSENRリガンDポリペプチドおよび合成ヒトSENRリガンDポリペプチド（urotensin II）の降圧作用

	投与量 (10 nmol/kg)	個体数	低下した平均血圧 (mmHg、平均値±標準偏差)
ブタSENRリガンD①	10	8	34.3 ± 4.6
ブタSENRリガンD②	10	8	35.3 ± 3.1
ウシSENRリガンD	10	8	35.7 ± 7.0
ヒトSENRリガンD	10	8	35.1 ± 5.7

実施例1 8 合成ブタSENRリガンDポリペプチドのラット胸部大動脈に対する収縮作用

- 15 実施例13で合成した種々の濃度のSENRリガンDポリペプチド②（配列番号：8）のラット胸部大動脈に対する作用を以下の方法により測定した。9-12週齢の雄性Wistar rat（日本チャールスリバーより購入）をネンブタール注射液（大日本製薬、50 mg/ml sodium pentobarbital、50 mg/kg腹腔内投与）により麻酔し、腹部大動脈より全線血して失血死させた。このラットより胸部大動脈を摘出し、幅5 mmのリング標本を作製した。標本を混合ガス（95% O₂-5% CO₂）を通気して37℃に保温したKrebs-Henseleit溶液（NaCl 118 mM、KCl 4.7 mM、CaCl₂ 2.5 mM、KH₂PO₄ 1.2 mM、NaHCO₃ 25 mM、MgSO₄ 1.2 mM、glucose 10.0 mM）3 mlを満たしたオーガンバス中に懸垂し、等尺性収縮張力を微小荷重変換器（UL-10CR、ミネベア社）を介してポリグラフ（NEC三栄社）で記録した。静止張力は約0.5 gとした。内皮の存在は、10⁻⁴ M norepinephrine投与によって惹起した収縮が10⁻⁴ M acetylcholine投与によって弛緩することを観察することによって確

認した。ブタSENRリガンドポリペプチドは終濃度 10^{-10} - 10^{-1} Mとなるように累
積投与した。ラット胸部大動脈リング標本はSENRリガンドの添加によって図10
に示すように用量依存的に収縮した。また、同様の活性はブタSENRリガンド①
(配列番号：7)、ウシSENRリガンド (配列番号：21) あるいはヒトSENRリガン
ド (ヒトurotensin II) (配列番号：22) を使用しても確認された。

5

実施例 19 ヒト骨格筋由来cDNAを用いたPCR法によるヒトSENR(=GPR14)受容
体cDNAの増幅

ヒト骨格筋由来cDNA (クロンテック社) を鋳型として用い、配列番号：23お
よび24の合成DNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。合成DNAプラ
イマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが
、その際に遺伝子の5'側に制限酵素Sal Iの認識する塩基配列が付加され、また
3'側に制限酵素Spc Iの認識する塩基配列が付加されるように、5'側および3'側に
それぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、cDNA鋳型2.5 μ l
、合成DNAプライマー各0.2 μ M、0.2 mM dNTPs、Advantage2 polymerase mix (ク
ロンテック社) 1 μ lおよび酵素に付属のパッファーで、総反応量は50 μ mlと
した。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を
用い、95 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、95 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・3分のサイクルを5回繰り返
し、その後、95 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・3分のサイクルを5回繰り返し、さらに、95 $^{\circ}$ C
・30秒、68 $^{\circ}$ C・3分のサイクルを20回繰り返し返して最後に68 $^{\circ}$ C・3分の加熱を行な
った。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロ
マイド染色によって行なった。

20

実施例 20 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび伸入
cDNA部分の塩基配列の解読による増幅cDNA配列の確認

25

実施例19で行なったPCR後の反応産物は0.8 %の底融点アガロースゲルを用い

で分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、GENECLEAN SPIN (パイオ
101社) を用いてDNAを回収した。Eukaryotic TOP0TM TA Cloning kit (イン
ビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAを動物細胞発現用プラスミドベクタ
ー-pcDNA3.1/V5/Hisへクローニングしてタンパク発現用プラスミドpcDNA3.1-
hSENRを構築した。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α
competent cell (東洋紡) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つク
ローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択し、滅菌したつま楊枝を用い
て分離して形質転換体E. coli DH5 α /pcDNA3.1-hSENRを得た。個々のクロー
ンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QuiaWell 8 Ultra Plasmid kit (キ
アゲン社) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いて
制限酵素Sal Iによる切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさお
よび方向性を確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator
Cycle Sequence Kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シー
ケンサーを用いて解読した。得られたクローンの配列を解析し、全ての配列が
報告されているヒトGPR14 (=SENR) 遺伝子 (EP 0 859 052 Al) の配列の5'側にSal
I認識配列が付加し、3'側にSpe I認識配列が付加した遺伝子配列と一致すること
を確認した (配列番号：25および26)。ただし、配列番号：25のヒトSENR遺伝
子の配列中1133番目の塩基は核報告 (EP 0 859 052 Al) ではCと記載されてい
るが、本実施例で決定した配列ではGであった。いずれの塩基についても翻訳さ
れたアミノ酸は同一である。

20

実施例 21 ヒトSENR発現CHO細胞の作製

実施例 20 で作製した形質転換体E. coli DH5 α /pcDNA3.1-hSENRを培養後、
Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いてpcDNA3.1-hSENRのプラスミドDNAを調
製した。これをCellPhect Transfection Kit (アマシャムファルマシアバイオ
テック社) を用い添付のプロトコルに従ってCHO dhfr細胞に導入した。10 μ gのDNA

25

をリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に 5×10^5 または 1×10^6 個の CHO dhfr⁻細胞を播種した10 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である0.4 mg/mlのG418 (ギブコ BRL社) および10%透析ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で培養した。選択培地中で増殖してくるヒトSENR発現CHO細胞である形質転換細胞 (CHO/hSENR) のコロニーを選択した。

実施例 2 2 合成ヒトSENRリガンドポリペプチド (ヒトurotensin II) の CHO/hSENR細胞株に対するアラキドン酸代謝物遊離促進活性

10 実施例15で合成した種々の濃度のヒトSENRリガンドポリペプチド (ヒトurotensin II) (配列番号: 22) が示すヒトSENR発現CHO細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性を以下の方法により測定した。CHO/hSENR細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、24時間培養後、 $[^3H]$ アラキドン酸を0.25 μ Ci/wellとなるよう添加した。 $[^3H]$ アラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05% ウシ血清アルブミン (BSA) を含むハンクス試液 (HBSS) で洗浄し、各wellに種々の濃度の合成ヒトSENRリガンドポリペプチドを加えた0.05% BSA含有HBSS 500 μ lを添加した。37℃で30分間インキュベートした後に、反応液500 μ lから350 μ lをシンチレーターに加え、反応中に遊離された $[^3H]$ アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定した。その結果、ヒトSENRリガンドポリペプチド (ヒトurotensin II, 配列番号: 22) のペプチドの濃度依存的にアラキドン酸代謝物の培地中への放出が確認された (図11)。なお、活性はバッファーのみを添加した対照区のアラキドン酸代謝物遊離量に対する百分率で示した。また、同様の活性はブタSENRリガンド (配列番号: 7および8) およびウシSENRリガンド (配列番号: 21) を使用しても確認された。

実施例 2 3 ウシSENRリガンドが誘起するSENR発現CHO細胞膜成分へのGTP γ S

結合活性の測定

ウシSENRリガンド (配列番号: 21) の ウシSENR発現CHO細胞膜成分に対する $[^3S]$ -guanosine 5'-(γ -thio)triphosphateの結合促進活性を以下の方法により測定した。最初に膜成分の調製法を記載する。 1×10^6 個のCHO/SENR細胞に10 mlのホモジネートバッファー (10 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatin, 4 μ g/ml E64, 20 μ g/ml leupeptin) を添加し、ポリロン (12,000 rpm, 1分間) を用いて破砕した。細胞破砕液を遠心 (1,000 g, 15分間) して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離 (Beckman type 30ローター, 30,000 rpm, 1時間) し、得られた沈殿物をラットSENR発現CHO細胞膜成分とした。

10 GTP γ S結合活性の測定は以下の通りである。ラットSENR発現CHO細胞膜成分を膜希釈緩衝液 (50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 μ M GDP) で希釈して、タンパク質濃度30 μ g/mlのアッセイ用細胞膜成分溶液をつくった。アッセイ用膜成分溶液200 μ lに、51.5 nM濃度の $[^3S]$ -guanosine 5'-(γ -thio)triphosphate (NEN社) を2 μ lと種々の濃度のウシSENRリガンド (配列番号: 21) を2 μ l添加し、この混合液を25℃で一時間保温する。混合液をフィルター越し、さらにフィルター洗浄用バッファー (50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.1% BSA) 1.5 mlで2回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定した。ウシSENRリガンドは、用置依存的に、膜成分に結合する $[^3S]$ -guanosine 5'-(γ -thio)triphosphate量を増大させた。また、同様の活性はブタSENRリガンド (配列番号: 7および8) あるいはヒトSENRリガンド (ヒトurotensin II) (配列番号: 22) を使用しても確認された。

実施例 2 4 ヒトSENRリガンドが誘起するヒトSENR発現CHO細胞膜成分へのGTP γ S結合活性の測定

25 ヒトSENRリガンド (ヒトurotensin II) (配列番号: 22) の ヒトSENR発現CHO

細胞膜画面对する [³⁵S]-guanosine 5'-(γ-thio)triphosphateの結合促進活性を以下の方法により測定した。最初に膜画分の調製法を記載する。1 x 10⁶個のCHO/hSENR細胞に10 mlのホモジネートバッファ（10 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 μg/ml pepstatin, 4 μg/ml E64, 20 μg/ml leupeptin）を添加し、ポリトロン（12,000 rpm, 1分間）を用いて破砕した。細胞破砕液を遠心（1,000 g, 15分間）して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離（Beckman type 30ローター, 30,000 rpm, 1時間）し、得られた沈殿物をヒトSENR発現CHO細胞膜画分とした。

GTPγS結合活性の測定は以下の通りである。ヒトSENR発現CHO細胞膜画分を膜希釈緩衝液（50 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.4）、5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 μM GDP）で希釈して、タンパク質濃度30 μg/mlのアッセイ用細胞膜画分溶液をつくった。アッセイ用膜画分溶液200 μlに、51.5 nM濃度の [³⁵S]-Guanosine 5'-(γ-thio)triphosphate（NEN社）を2 μlと種々の濃度のヒトSENRリガンド（配列番号：22）を2 μl添加し、この混合液を25℃で一時間保温した。混合液をフィルター透過し、さらにフィルター洗浄用バッファ（50 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.4）、5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.1% BSA）1.5 mlで2回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定した。ヒトSENRリガンドは、用直後存的に、膜画分に結合する [³⁵S]-guanosine 5'-(γ-thio)triphosphate量を増大させた。また、同様の活性はブタSENRリガンド（配列番号：7および8）あるいはウシSENRリガンド（配列番号：21）を使用しても確認された。

実施例 2 5 アイソトープ標識ウシSENRリガンドの作製

結合阻害実験に使用するためのアイソトープ標識ウシSENRリガンドを以下のようにして作製した。ウシSENRリガンド（配列番号：21）5 μgを25 μlの0.4 M 酢酸ナトリウム（pH 5.6）に溶解し、これに200 ngのラクトパーオキシダーゼ

（和光純薬製）を加えた後、1 mCiの [³⁵S]-ヨウ化ナトリウム（アマシャムファルマシアバイオテック社）および200 ngの過酸化水素（10 μl）を加えた。室温で10分間静置した後、さらに200 ngの過酸化水素（10 μl）を加えて10分間静置した。これをTSXgel ODS-801カラム（4.6 mm x 25 cm, トーソー）を用いたHPLCによって精製し、 [³⁵S]標識ウシSENRリガンドを得た。同様にして、ブタSENRリガンド（配列番号：7および8）あるいはヒトSENRリガンド（配列番号：22）の [³⁵S]標識体を作製した。

実施例 2 6 アイソトープ標識ウシSENRリガンドとCHO/SENR細胞を使用した結合阻害実験

実施例25で作製した [³⁵S]標識ウシSENRリガンドとラットSENR発現CHO細胞を使用した結合阻害実験の方法を以下に示す。CHO/SENR細胞を24穴プレートに5 x 10⁴ cell/wellで播種して48時間培養し、その後細胞を0.05% BSAを含むMEM α培地0.5 mlで洗った（以下0.05% BSAを含むMEM α培地を反応用バッファと呼ぶ）。総結合を調べるために200 pM [³⁵S]標識ウシSENRリガンドを含む反応用バッファ、非特異的結合を調べるために200 pM [³⁵S]標識ウシSENRリガンドと1 μM非アイソトープ標識ウシSENRリガンドを含む反応用バッファ、さらにSENR受容体に対する結合活性を調べる試料と200 pM [³⁵S]標識ウシSENRリガンドを含む反応用バッファ、各0.5 mlをそれぞれ細胞に添加し、室温で30分間反応させた。細胞を反応用バッファで洗浄した後、0.5 N NaOHを0.2 ml添加して細胞を溶解し、溶解物の放射活性をガンマカウンタにより測定した。特異的結合は、総結合から非特異的結合を減じた値である。被験試料のラットSENR受容体結合活性は、総結合から試料を加えた細胞溶解物の放射活性を減じた値の特異的結合に対する比率で示される。

25

実施例 2 7 アイソトープ標識ヒトSENRリガンドとCHO/hSENR細胞を使用した

結合阻害実験

実施例25と同様にしてヒトSENRリガンド（配列番号：22）を $[^{125}\text{I}]$ 標識して作製した $[^{125}\text{I}]$ 標識ヒトSENRリガンドとヒトSENR発現CHO細胞を使用した結合阻害実験の方法を以下に示す。CHO/hSENR細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種して48時間培養し、その後細胞を0.05% BSAを含むMEM α 培地0.5mlで洗った（以下0.05% BSAを含むMEM α 培地を反応用バッファと呼ぶ）。総結合を調べるために150 pM $[^{125}\text{I}]$ 標識ヒトSENRリガンドを含む反応用バッファ、非特異的結合を調べるために150 pM $[^{125}\text{I}]$ 標識ヒトSENRリガンドと1 μM 非アイソトープ標識ヒトSENRリガンドを含む反応用バッファ、さらにヒトSENR受容体に對する結合活性を調べる試料と150 M $[^{125}\text{I}]$ 標識ヒトSENRリガンドを含む反応用バッファ、各0.5 mlをそれぞれ細胞に添加し、室温で30分間反応させた。細胞を反応用バッファで洗浄した後、0.5 N NaOHを0.2 ml添加して細胞を溶解し、溶解物の放射活性をガンマカウンタにより測定した。特異的結合は、総結合から非特異的結合を減じた値である。被験試料のヒトSENR受容体結合活性に対する比率で示される。

実施例 2 8 アイソトープ標識ウシSENRリガンドとCHO/SENR細胞膜画分を使用した結合阻害実験

実施例25で作製した $[^{125}\text{I}]$ 標識ウシSENRリガンドとラットSENR発現CHO細胞の膜画分を使用した結合阻害実験の方法を以下に示す。実施例23に記載した、CHO/SENR細胞から調製した膜画分を膜希釈緩衝液（50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）、5 mM MgCl₂、0.1% BSA、5 mM EDTA、0.5 mM PMSF、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pcstatin、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ E64、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin）で希釈して、タンパク質濃度1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に、総結合アッセイ用細胞膜画分溶液をつくった。アッセイ用膜画分溶液100 μl に、総結合を調べるために200 pM $[^{125}\text{I}]$ 標識ウシSENRリガンドを含む膜希釈緩衝液、非

特異的結合を調べるために200 pM $[^{125}\text{I}]$ 標識ウシSENRリガンドと2 μM 非アイソトープ標識ウシSENRリガンドを含む膜希釈緩衝液、さらにラットSENR受容体に對する結合活性を調べる試料と200 pM $[^{125}\text{I}]$ 標識ウシSENRリガンドを含む膜希釈緩衝液、各100 μl をそれぞれ添加して室温で60分間反応させた。混合液をフィルター透過し、さらにフィルターを膜希釈緩衝液1.5 mlで2回洗浄した後、フィルターの放射活性をガンマカウンタにより測定した。特異的結合は、総結合から非特異的結合を減じた値である。被験試料のラットSENR受容体結合活性は、総結合から試料を加えた細胞膜画分の放射活性を減じた値の特異的結合に対する比率で示される。図12に種々の濃度のウシSENRリガンドの結合活性を示した。

実施例 2 9 アイソトープ標識ヒトSENRリガンドとCHO/hSENR細胞膜画分を使用した結合阻害実験

実施例25と同様にしてヒトSENRリガンド（配列番号：22）を $[^{125}\text{I}]$ 標識して作製した $[^{125}\text{I}]$ 標識ヒトSENRリガンドとヒトSENR発現CHO細胞の膜画分を使用した結合阻害実験の方法を以下に示す。実施例24に記載した、CHO/hSENR細胞から調製した膜画分を膜希釈緩衝液（50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）、5 mM MgCl₂、0.1% BSA、5 mM EDTA、0.5 mM PMSF、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pcstatin、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ E64、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin）で希釈して、タンパク質濃度60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアッセイ用細胞膜画分溶液をつくった。アッセイ用膜画分溶液100 μl に、総結合を調べるために150 pM $[^{125}\text{I}]$ 標識ヒトSENRリガンドを含む膜希釈緩衝液、非特異的結合を調べるために150 pM $[^{125}\text{I}]$ 標識ヒトSENRリガンドと2 μM 非アイソトープ標識ヒトSENRリガンドを含む膜希釈緩衝液、さらにヒトSENR受容体に對する結合活性を調べる試料と150 pM $[^{125}\text{I}]$ 標識ヒトSENRリガンドを含む膜希釈緩衝液、各100 μl をそれぞれ添加して室温で60分間反応させた。混合液をフィルター透過し、さらにフィルターを膜希釈緩衝液1.5 mlで2回洗浄した後、フィルターの放射活

性をガンマカウンタにより測定した。特異的結合は、総結合から非特異的結合を減じた値である。放射線試料のヒトSENR受容体結合活性は、総結合から試料を加えた細胞膜画分の放射線活性を減じた値の特異的結合に対する比率で示される。図13に種々の濃度のヒトSENRリガンドの結合活性を示した。

5

実施例 3 0 合成ウシSENRリガンドのラットSENR発現CHO細胞に対するcAMP合成抑制活性

実施例 14 で合成したウシSENRリガンド (配列番号: 21) が示すラットSENR発現CHO細胞に対するcAMP合成抑制活性を以下に示す方法で測定した。CHO/SENR細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2 mM 3-イソプロピル-メチルキサンチンと0.05% BSAと20 mM HEPESを含むハンクスバッファ(pH 7.4)で洗浄した (以下、0.2 mM 3-イソプロピル-メチルキサンチンと0.05% BSAと20 mM HEPESを含むハンクスバッファと呼ぶ)。その後0.5 mlの反応用バッファを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファを細胞に加えた後、種々の量のヒトSENRリガンドと2 μM フォルスコリンを加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット (アマシャムファルマシアパイオテック) を用いて測定した。その結果、ウシSENRリガンドは0.3 nMの濃度で明らかに細胞内cAMP量を低下させ、さらにベズチド濃度を増やすと容量依存的に細胞内cAMP量は減少した。また、同様の活性はブタSENRリガンド①および② (配列番号: 7および8) あるいはヒトSENRリガンド (ヒトurotensin II) (配列番号: 22) を使用しても確認された。

25

実施例 3 1 合成ヒトSENRリガンドのヒトSENR発現CHO細胞に対するcAMP合成

抑制活性

実施例 15 で合成したヒトSENRリガンド (ヒトurotensin II) (配列番号: 22) が示すヒトSENR発現CHO細胞に対するcAMP合成抑制活性を以下に示す方法で測定した。CHO/SENR細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2 mM 3-イソプロピル-メチルキサンチンと0.05% BSAと20 mM HEPESを含むハンクスバッファ(pH 7.4)で洗浄した (以下、0.2 mM 3-イソプロピル-メチルキサンチンと0.05% BSAと20 mM HEPESを含むハンクスバッファと呼ぶ)。その後0.5 mlの反応用バッファを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファを除き、新たに0.25 mlの反応用バッファを細胞に加えた後、種々の量のヒトSENRリガンドと2 μM フォルスコリンを含む0.25 mlの反応用バッファを細胞に加えて37°Cで24分間反応させた。100 μlの20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット (アマシャムファルマシアパイオテック) を用いて測定した。その結果、ヒトSENRリガンドは0.3 nMの濃度で明らかに細胞内cAMP量を低下させ、さらにベズチド濃度を増やすと容量依存的に細胞内cAMP量は減少した。また、同様の活性はブタSENRリガンド①および② (配列番号: 7および8) あるいはウシSENRリガンド (配列番号: 21) を使用しても確認された。

実施例 3 2 PCR法によるウシSENRリガンド前駆体タンパク質の部分配列の決定

ウシゲノムDNA (クローンテック社) を鋳型に、配列番号: 10および配列番号: 11で表されるプライマーを用いてPCR反応を行なった。反応液の組成は、合成プライマーは配列番号: 10で表されるプライマーが5 μM、配列番号: 11で表されるプライマーが1 μM、鋳型DNA 50 ng、0.2 mM dNTPs、2.5 mM NaCl、AmpliTaq Gold DNA polymerase (パーキンエルマー社) 0.4 μlおよび10倍濃縮のAmpliTaq

Gold buffer 1/10 量で総反応液量は40 μlとした。増幅のためのサイクルは、サ
ーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を使い、95℃で9分保温した後、94℃
・15秒、60℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを4回、94℃・15秒、52.5℃・20秒、
72℃・20秒のサイクルを6回、94℃・20秒、52.5℃・20秒、72℃・20秒のサイ
クルを6回、94℃・20秒、50℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを8回、94℃・15
秒、48℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを30回繰り返した後、72℃で7分保温し
た。得られた反応液2 μlをTOP0 TA cloning kit (インビトロジェン社) を使い
てプラスミドベクター-per 2.1へサブクローニングし、大腸菌TOP10へ導入した
。生じた形質転換体からQIA prep8 mini prep (キアゲン社) を用いてプラスミ
ドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle
Sequence Kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサ
ーを用いて解読した。その結果、PCR産物として、ブタSENRRリガンド前駆体の配
列と類似することからウシSENRRリガンド前駆体の一部をコードすると考えられ
る配列番号：20が得られた。

15

実施例 3 3 ウシ全脳cDNAの調製

ウシ全脳poly (A)⁺RNA (クロンテック社) 1.0 μgから、ThermoScript逆転写
酵素(ギブコ BRL社)を用い、マニユアルにしたがってoligo (dT) プライマーを
用いて60℃で逆転写を行ない、cDNAを作成した。このcDNAについてMarathon cDNA
amplification kit (クロンテック社)のマニユアルに従って第二ストランドの
合成およびアダプター配列の付加を行った。

20

実施例 3 4 5'-RACE法によるウシSENRRリガンド前駆体タンパク質をコードする
遺伝子の5'側の配列の取得

実施例 3 3 で得た2本鎖cDNA調製液の4 ng mRNA相当分を鋳型にし、Marathon
cDNA amplification kit (クロンテック社)に付属のアダプタープライマー-API

および配列番号：3 1 で表されるプライマーを用いてPCRを行なった。反応液の
組成は、合成プライマーは配列番号：3 1 で表されるプライマーが0.5 μM、API
が0.2 μM、0.2 mM dNTPs、2.5 mM MgCl₂、AmpliTaq Gold DNA polymerase (パー
キンエルマー社) 0.2 μlおよび10倍濃縮のAmpliTaq Gold buffer 1/10 量で総
反応液量は20 μlとした。増幅のためのサイクルは、サーマルサイクラー (パー
キンエルマー社) を使い、95℃で9分保温した後、95℃・10秒、68℃・1分のサイ
クルを40回繰り返した。この反応液の0.04 μl相当分を鋳型にし、アダプター
プライマー-APIをAP2、配列番号：3 1 で表されるプライマーを配列番号：3 2
で表されるプライマーに置き換えてPCRを行なった。反応液の組成は、合成プラ
イマーは配列番号：3 2 で表されるプライマーが0.5 μM、AP2が0.2 μM、0.2 mM
dNTPs、2.5 mM MgCl₂、AmpliTaq Gold DNA polymerase (パーキンエルマー社) 0.2
μlおよび10倍濃縮のAmpliTaq Gold buffer 1/10 量で総反応液量は20 μlとした
。増幅のためのサイクルは、サーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を用
い、95℃・9分保温した後、95℃・10秒、66℃・1分のサイクルを40回繰り返し
た後、72℃・10分保温した。PCR反応液を3.5% Nusieve GTG Agarose (宝酒造)
を用いて電気泳動してエチジウムブロマイドによる染色によって検出される
420 bp付近のバンドからGeneClean Spin kit (バイオ101社) によってDNAを抽
出し、TOP0 TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミドper 2.1
にサブクローニングを行なって大腸菌TOP10へ導入した。生じた形質転換体か
らQIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミドDNAを精製した
。塩基配列決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit (パー
キンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し
たところ、配列番号：3 3 に示す配列が得られた。

20

25 実施例 3 5 3'-RACE法によるウシSENRRリガンド前駆体タンパク質をコードする
遺伝子の3'側の配列の取得

- 実施例 3 3 で得た 2 本鎖 cDNA 調製液の 4 ng mRNA 相当分を鋳型にし、Marathon cDNA amplification kit (クローニング社) に付属のアダプタープライマー-API および配列番号: 3 4 で表されるプライマーを用いて PCR を行なった。反応液の組成は、合成プライマーは配列番号: 3 4 で表されるプライマーが 0. 2 μ M, API が 0. 2 μ M, 0. 2 mM dNTPs, 2. 5 mM MgCl₂, AmpliTaq Gold DNA polymerase (パーキンエルマー社) 0. 2 μ l および 10 倍濃縮の AmpliTaq Gold buffer 1/10 量で総反応液量は 20 μ l とした。増幅のためのサイクルは、サーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を使い、95℃ で 9 分保温した後、68℃・10 秒・1 分のサイクルを 40 回繰り返した。この反応液の 0. 04 μ l 相当分を鋳型にし、アダプタープライマー-API を AP2、配列番号: 3 4 で表されるプライマーを配列番号: 3 5 で表されるプライマーに置き換えて PCR を行なった。反応液の組成は、合成プライマーは配列番号: 3 5 で表されるプライマーが 0. 2 μ M, AP2 が 0. 2 μ M, 0. 2 mM dNTPs, 2. 5 mM MgCl₂, AmpliTaq Gold DNA polymerase (パーキンエルマー社) 0. 2 μ l および 10 倍濃縮の AmpliTaq Gold buffer 1/10 量で総反応液量は 20 μ l とした。増幅のためのサイクルは、サーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を使い、95℃・9 分保温した後、95℃・10 秒・1 分のサイクルを 40 回繰り返した後、72℃・10 分保温した。PCR 反応液を 3. 5% Nusieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動してエチジウムブロマイドによる染色によって検出される 300 bp 付近のバンドから GeneClean Spin kit (バイオ101社) によって DNA を抽出し、TOP10 TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミド pcr 2. 1 にサブクローニングを行なって大腸菌 TOP10 へ導入した。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読したところ、配列番号: 3 6 に示す配列が得られた。

- 実施例 3 6 ウシ SENSE リガンド前駆体タンパク質をコードする遺伝子の全長配列の取得
- 実施例 3 4 および実施例 3 5 に述べたようにして RACE 法を用いて得られた 5' 末端側および 3' 末端側の配列情報から予想されるウシ SENSE リガンド前駆体タンパク質をコードする cDNA の全長を含む配列を得るため、実施例 3 3 で得られた 2 本鎖 cDNA 調製液の 4 ng mRNA 相当分を鋳型とし、配列番号: 3 7 および配列番号: 3 8 で表されるプライマーを用いて PCR を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度をともに 0. 5 μ M とし、0. 2 mM dNTPs, 2. 5 mM MgCl₂, AmpliTaq Gold DNA polymerase (パーキンエルマー社) 0. 2 μ l および 10 倍濃縮の AmpliTaq Gold buffer 1/10 量で総反応液量は 20 μ l とした。増幅のためのサイクルは、サーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を使い、95℃ で 9 分保温した後、95℃・10 秒・20 秒・1 分のサイクルを 40 回繰り返した後、72℃ で 10 分保温した。PCR 反応液を 3. 5% Nusieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動してエチジウムブロマイドによる染色によって検出される 490 bp 付近のバンドから GeneClean Spin kit (バイオ101社) によって DNA を抽出し、TOP10 TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミド pcr 2. 1 にサブクローニングを行なって大腸菌 TOP10 へ導入した。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読したところ、配列番号: 3 0 に示す配列が得られた。この配列にはウシ SENSE リガンド前駆体の全長が含まれていた。この plasmid で大腸菌 TOP10 を形質転換して Escherichia coli TOP10/pCR-buro を得た。配列番号: 3 0 から翻訳されるウシ SENSE リガンド前駆体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号: 2 9 に示す。また、ウシ SENSE リガンド前駆体タンパク質のアミノ酸配列から予想されるウシ SENSE リガンドのアミノ酸配列を配列番号: 2 1 に、それをコードする DNA の塩基配列を配列番号: 2 8

にそれぞれ示す。また、ウシSENRリガンド前駆体タンパク質の全塩基配列およびアミノ酸配列を図14に示す。

実施例37 SENRリガンドポリペプチドに対する抗体の作製

- 5 ブタ、ウシおよびヒトSENRリガンドポリペプチドとC末端側の構造 (Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val) が一致するハゼ (long-jawed mudsucker, *Gillichthys mirabilis*) ウロテンシンII (配列番号: 39) を抗原としてSENRリガンドポリペプチドのC末端側を認識する抗体を作製した。1 mgのハゼウロテンシンII ペプチドと4 mgのBTG (bovine thyroglobulin) を、30 mgのECDI (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, 同に化学) により結合させ、ハゼウロテンシンII-キヤリアタンパク複合体を作製した。ハゼウロテンシンII-キヤリアタンパク複合体を0.15 M NaCl水溶液に対して透析した後、透析液とフロイントの完全アジュバントを混ぜ、これを抗原として1頭当たりハゼウロテンシンII 20 μ g相当をBalb/cマウス (雌、6~8週令) に初回免疫した。初回免疫から3週間後、複合体とフロイントの不完全アジュバントを混ぜ、これを抗原として2回目の免疫をした。抗体価が上昇するまで、2週間おきに複合体とフロイントの不完全アジュバント混合物を免疫した。

- 15 抗体価の測定は、ビオチン化ハゼウロテンシンII ペプチドを利用した酵素免疫測定法で行なった。ビオチン化ハゼウロテンシンII ペプチド (N-biotinyl-roten-sin II) は、NHS-biotin (N-hydroxysuccinimidobiotin) とハゼウロテンシンII ペプチドの反応物をHPLC分取することで得た。得られたN末端ラベル体のビオチン化ハゼウロテンシンII ペプチドの構造は、質量分析とアミノ末端配列分析においてN末が検出できないことにより確定した。酵素免疫測定法は以下の通り。抗マウスIgGヒツジIgG画分溶液をコートした96穴イムノプレート
- 20 をブロックエース (大日本製薬) でブロックした後、段階希釈した免疫マウス血清とビオチン化ハゼウロテンシンII ペプチドをウェル内で4℃にて16時間反

応させた。次にウェルを洗浄後、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンをウェル内で室温にて4時間反応させた。最後にウェルを洗浄後、パーオキシダーゼ基質をウェルに加え、基質の発色を96穴マルチフォトメーターで測定した。

- 5 基質の発色が認められたウェルに添加した血清を抗体価が上昇していると判断した。ここで検出される抗体はN末端ラベル体のビオチン化ハゼウロテンシンII と結合することからこのペプチドのC末端側の構造を認識するものと考えられる。こうした血清に含まれる抗体がブタ、ウシおよびヒトSENRリガンドポリペプチドを認識していることは、上記の酵素免疫測定法においてこれらのペプチドをウェルに添加することによってビオチン化ハゼウロテンシンII ペプチドと抗体との結合が阻害され、その結果、発色が阻害されることによって確認した。

(配列表フリーテキスト)

配列番号: 7

- 15 配列に関する他の情報: 第6番目および第11番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号: 8

- 20 配列に関する他の情報: 第6番目および第11番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号: 21

- 25 配列に関する他の情報: 第6番目および第11番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号: 22

- 30 配列に関する他の情報: 第5番目および第10番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号: 39

配列に関する他の情報：第5番目および第11番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

産業上の利用可能性

- 5 本発明のポリペプチドをコードするDNAまたは本発明のポリペプチドは、
①本発明のポリペプチドの有する生理作用の探索、②合成オリゴヌクレオチド
プローブあるいはPCRのプライマーの作成、③SENRのリガンドや前駆体
タンパク質をコードするDNAの入手、④組換え型レセプタータンパク質の発
現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリー
ニング、⑤抗体および抗血清の入手、⑥DNA、RNA、抗体または抗血清を
用いた診断薬の開発、⑦中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節
剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤、感覚器機能調節剤などの医薬の開
発、⑧遺伝子治療等に用いることができる。
- 10

請求の範囲

1. 配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

- 5 2. 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：8または配列番号：21で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

3. 請求項1記載のポリペプチドの前駆体タンパク質またはその塩。

4. 配列番号：18または配列番号：19で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項3記載の前駆体タンパク質またはその塩。

5. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

6. 配列番号：27または配列番号：28で表される塩基配列を有する請求項5記載のDNA。

7. 請求項3記載の前駆体タンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

8. 配列番号：15、配列番号：16または配列番号：17で表される塩基配列を有する請求項7記載のDNA。

9. 請求項5または請求項7記載のDNAを含有する組換えベクター。

10. 請求項9記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

11. 請求項10記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の前駆体タンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することと特徴とする請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはその

- 25 エステルまたはその塩、または請求項3記載の前駆体タンパク質もしくはその塩の製造法。

1 2. 請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
またはその塩、または請求項 3 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩に対す
る抗体。

1 3. 請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
またはその塩、または請求項 3 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩を含有
してなる医薬。

1 4. 請求項 5 または請求項 7 記載の DNA を含有してなる医薬。

1 5. 中枢機能調節剤、視覚機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、
泌尿器機能調節剤または感覚器官機能調節剤である請求項 1 3 または請求項 1
4 記載の医薬。

1 6. 請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
またはその塩または請求項 3 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩を用いる
ことを特徴とする S E N R と請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミド
もしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 3 記載の前駆体タンパク質
もしくはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング
方法。

1 7. 請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
またはその塩、または請求項 3 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩を含有
してなる S E N R と請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくは
そのエステルまたはその塩、または請求項 3 記載の前駆体タンパク質もしくは
その塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット

1 8. 配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくは
はそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする S
E N R と配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもし
くはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化

合物またはその塩のスクリーニング方法。

1 9. 配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくは
はそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる S E N R と配
列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのア
ミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物または
その塩のスクリーニング用キット。

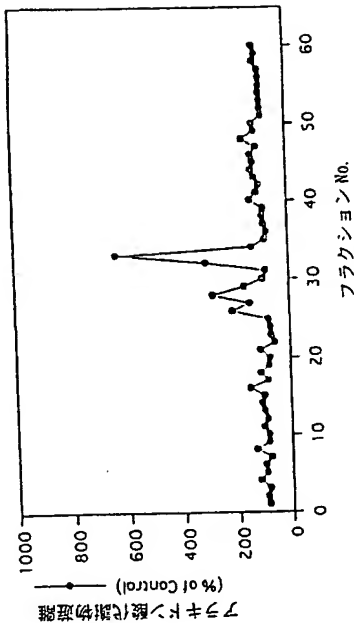
2 0. 請求項 1 6 もしくは請求項 1 8 記載のスクリーニング方法または請求項
1 7 もしくは請求項 1 9 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、①
S E N R と請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエス
テルまたはその塩、または請求項 3 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩、
または② S E N R と配列番号：22 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペ
プチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変
化させる化合物またはその塩。

2 1. 請求項 2 0 記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする高血
圧症の予防・治療薬。

2 2. 請求項 1 2 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載のポリペ
プチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項
3 記載のタンパク質もしくはその塩の定量方法。

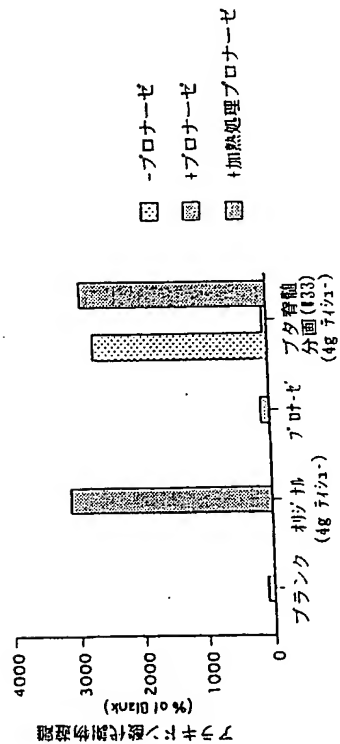
2 3. 請求項 1 2 記載の抗体を含有することを特徴とする請求項 1 記載のポリ
ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求
項 3 記載の前駆体タンパク質もしくはその塩の機能が関与する疾患の診断剤。

5'- GTGCATGG CTCTGAGCT GGAGCTTACA ACAAGCTTTC ATATGCTCAC 50
CGTCTCGGGA AGCACTGTGA CTGAGCTGGC TGGTACTCC AACGTGTCCC 100
TCAACAGTTC CTGCTCGGCG CCACAGATC CCAGCTCCCT GAAAGACCTT 150
GTGGCCAGG GTGTCATGGG GGCAGTCTC TCAGCCATGG GTGTGGTGGG 200
CATGGTGGGA AATGTATACA CTTTGGTGGT CATGTGCCGG TTCTCGGTG 250
CTCTGGCTC CAGTACCTC TATGTGTGA ACCTAGGCTT GGTGATCTG 300
CTGTACCTGC TCAGCATTCG CTTTCATCATA GCCACCTACG TCACCTAAGA 350
CTGGCACTTT GGAGATGTGG GCTGCAGAGT CCTCTTTAGC CTGGACTTCC 400
TGACAAATGA CCGCAGCATC TTACCCCTGA CCATATGAG CAGCGAACGC 450
TATGCAGCCG TACTGAGGCC TCTGGACACA GTCCAGCGCT CCAAGGGTTA 500
CCGTAAGCTG CTGGTCTGG GCACCTGGTT GCTGGCACTG CTGCTGACCC 550
TACCAATGAT CTTTGGCATC CAGTGTGTC GCAGGGGCTC TAAAGCCCTC 600
TGCCTGCCAG CCGTGGGGCC TCGTGGCCAG CGTACTTACC TACGTTGCT 650
CTTTGGNCC AGCATGTGG GGCCTGGCTT GGTATTGGG CTGCTCTATG 700
TCGGTCTGGC CAGGGCTTAC TGGCTATCTC AGCAAGCTTC TTTCAGGCAG 750
ACAGGGGCGG TGCCCAACCC CAGGGTCTC TACCTATCC TTGGTATCGT 800
CCTTCTCTTC TGGGCTTCTT TTCTACCTTT CTGGCTGTGG CAGCTGTGG 850
CCGAGTACCA CGAGGCGATG CCACTGACTC CCGAGACTGC AGGCAATTGC 900
AATCTACTGA CCACCTGCTT CACTTATGGC AACAGTTGCA TCAATCCCTT 950
CCTCTACACT CTGCTACCA AGACTATCG AGAGTACCTA CGTGGCGGCC 1000
AGCGTCACT GGTGTAGT TGGCAGAGCC CAGGAGTCC TGGCAGCTTC 1050
CTGCCCGCC GAGTCCACCT CCAGCAGGAC TCGGGCGCT CCGTGTCTTC 1100
CAGCAGCCAA CAGCCACAG AGACCTCAT GCTGTCTCCA GTCCCCGTA 1150
ACGGGGCCCT TCTCTGAG TGCATGTGC AATACTACT-3'





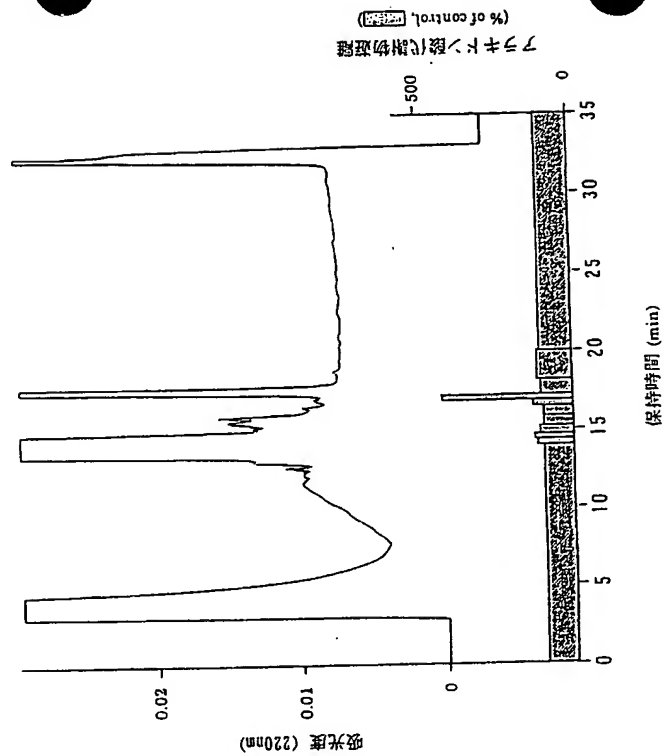
3



差替え用紙 (規則26)

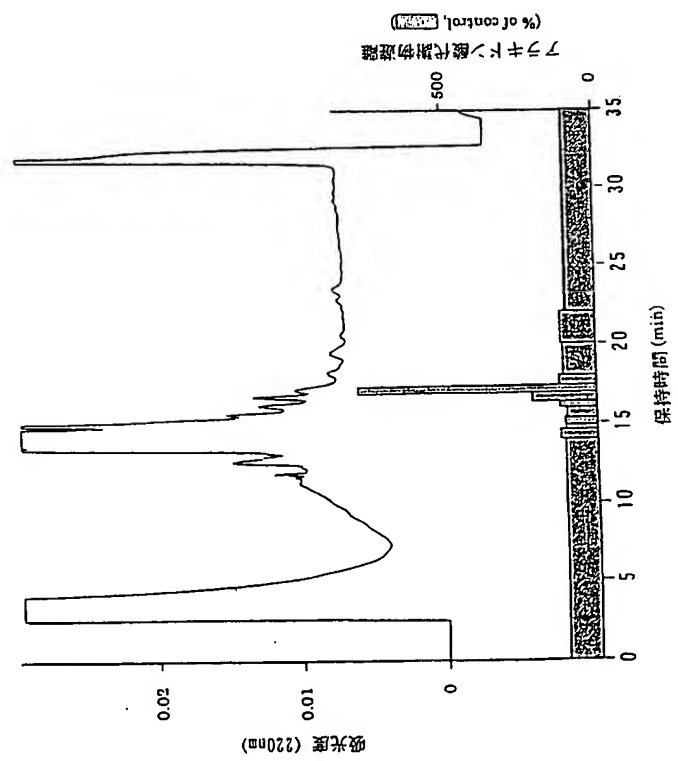


4



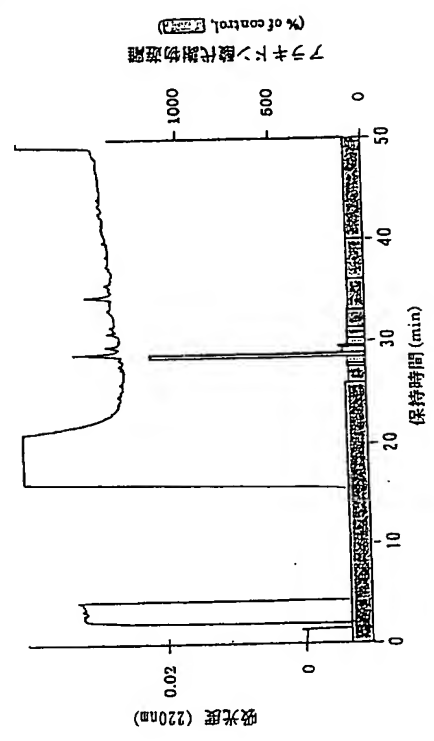
差替え用紙 (規則26)

☒ 5



差替え用紙 (規則26)

☒ 6



差替え用紙 (規則26)

7/14

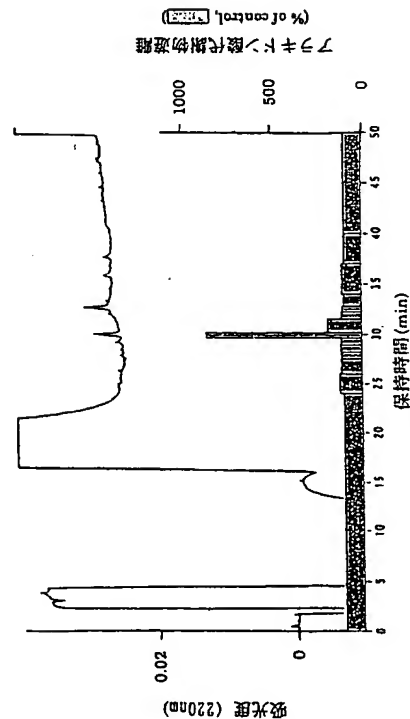


7

8/14



8



差替え用紙 (規則26)

1
ACT TGA GGC TTC GGA CCA ACA GAA GCC AGG MAG GAA GTG TGC TGC CTC CTC GCA GTC ATG Met

20
TCC AMG CTG GTC GGC TGC TTC CTC CTC CTA GGA TGC TTA GGT CTC CTC TTC GCT CTT GGC Ser Lys Leu Val Pro Cys Leu Leu Leu Gly Cys Leu Gly Leu Leu Phe Ala Leu Pro

30 40
GTC CCT GAC TCC AGG AAA GAG CCC CTG CCC TTC TCA GCA CCT GAA GAT GTC AGA TCA GCT Val Pro Asp Ser Arg Lys Glu Pro Leu Pro Phe Ser Ala Pro Glu Asp Val Arg Ser Ala

50 60
TGG GAT CTG GAA AGA GGC TCC CTT CTT CAG ATG CTG CCA GAG AGC CCA GGT GCA GAG Trp Asp Glu Leu Glu Arg Ala Ser Leu Leu Gln Met Leu Pro Glu Thr Pro Gly Ala Glu

70 80
GCA GGA GAG GAT CTC AGG GAA GCA GAT GCC GGA ATG GAC ATT TTT TAC CCA AGA GAA Ala Gly Glu Asp Leu Arg Glu Ala Asp Ala Gly Met Asp Ile Phe Tyr Pro Arg Gly Glu

90 100
ATG AGA MAG GGT TTC TCT GGA CAA GAT CCT AAC ATT TTT CTC AGT CAC CTT TTG GGC AGA Met Arg Lys Ala Phe Ser Gly Gln Asp Pro Asn Ile Phe Leu Ser His Leu Leu Ala Arg

110 120
ATC MAG AAA CCA TAC MAG AAA CGT GGC CCC CCG TCT GAA TGC TTC TGG AAA TAC TGT GTG Ile Lys Lys Pro Tyr Tyr Lys Arg Gly Pro Pro Ser Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val

TGA AGT CAC CTC AAC MAC CAT CTT AGA AAA TGT AAA AAA AGT GCT TCA CTT GAC AGC

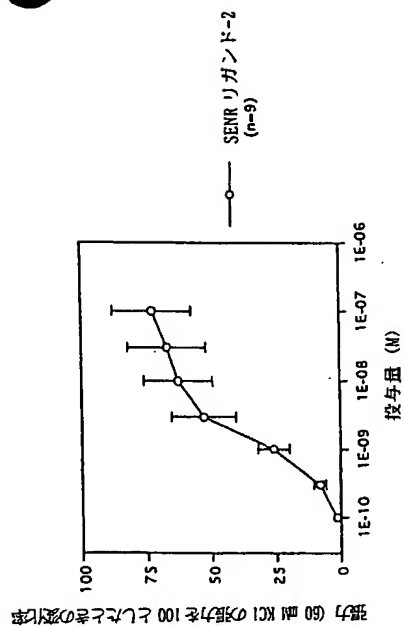
ACT GCA GAT GAA AAA CCA GGC AAA CCC TAC TCT GAT TAT TAT CTC GAA AAT AAA CCC

TTT GTG TTT GGC MAG TTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A

10/14

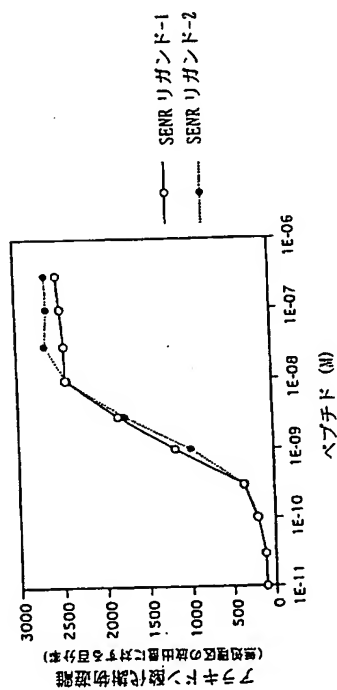
☒ 10



差替え用紙 (規則26)

9/14

☒ 9



差替え用紙 (規則26)

図 12

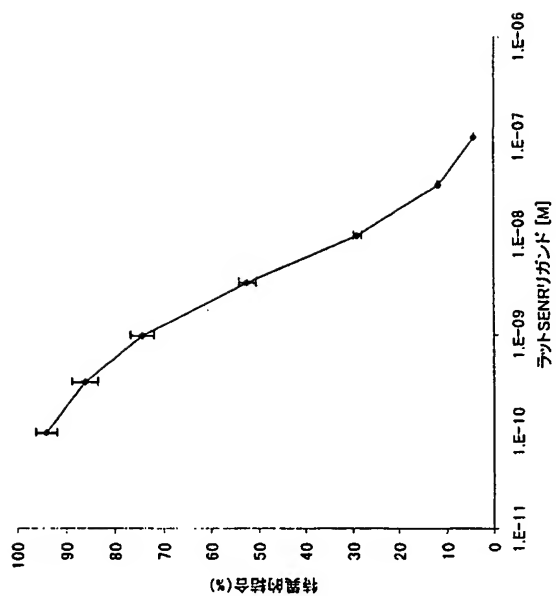
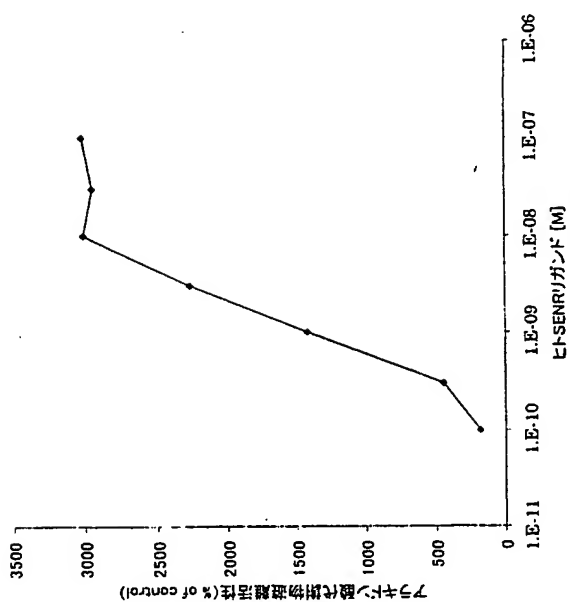


図 11



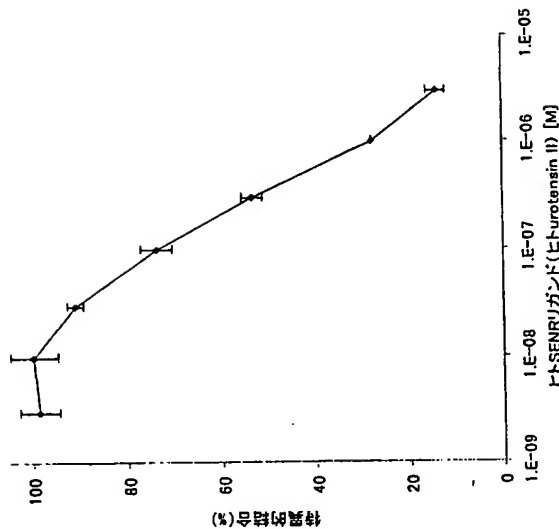
13/14

☒ 13

14/14

☒ 14

ATG TAT AAG CTC GTC TCC TGC TGT TTG CTT TTG ATA GGA TCC TTA AAT CCG CTC CTC TCT
Met Tyr Lys Leu Val Ser Cys Leu Leu Phe Ile Gly Ser Leu Asn Pro Leu Leu Ser
10
CTT CTT CTC CTT GAC TCC AGC CAA GAG TCC CTC CAG CTC TTA GCA CCT GAA GAT CTC AGA
Leu Pro Val Leu Asp Ser Arg Gln Gln Ser Leu Leu Gln Leu Leu Ala Pro Gln Asp Val Arg
20
TCA ACT CTC GAT GAG CTC GAA AGA GCG TCT CTT CTC CAG ATC CTC GCA GAG ATC TCA GCG
Ser Thr Leu Asp Gln Leu Gln Arg Ala Ser Leu Leu Gln Met Leu Pro Gln Met Ser Gly
30
GCA GAG ACA GCA GAG GGT CTT AGC AAC ACA GAT CCG ATT ACC AAC ATT TTT TAC CCA AGA
Ala Gln Thr Gly Gln Gly Leu Arg Asn Thr Asp Pro Ile Thr Asn Ile Phe Tyr Pro Arg
40
GGA AAC ATC AGA AAG GCC TTC TCT GCG CAA GAT CTT AAG CTT TTC CTC AGT GAC CTT TTC
Gly Asn Met Arg Lys Ala Phe Ser Gly Gln Asp Pro Lys Leu Phe Leu Ser Asp Leu
50
TCC AGA ATT AGC AAA CAA TCT AAG AAA CTT GGA CCT TCC TCT GAA TGC TTC TGG AAA TAC
Ser Arg Ile Arg Lys Gln Ser Lys Lys Arg Gln Pro Ser Ser Gln Cys Phe Trp Lys Tyr
60
TGT CTC TCA AGC AAA ATG ACC CTC TAC TAG TTA CTT CCA AGA CCA CCA TCT GAG AAA ATG
Cys Val ***
TAA AAT AAA GA



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Polypeptide, Its Production and Use

<130> 2573W00P

<150> JP 10-338984

<151> 1998-11-30

<150> JP 11-026848

<151> 1999-02-04

<150> JP 11-239367

<151> 1999-08-26

<160> 39

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 1

GTGACATGG CTCTGAGCCT GGAGTCTACA AC 32

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 2

ACTAGTATTC CACAGTGCAC TCTGACAGAA GG 32

<210> 3

<211> 1189

<212> DNA

<213> Rat

<400> 3

GTGACATGG CTCTGAGCCT GGAGTCTACA ACAAGCTTTC ATATGCTCAC CGTGTCCGGA 60
AGCACTGCA CTGAGCTGCC TGGTACTCC AACGTGTCCC TCAACAGTTC CTGGTCCGGC 120
CCACAGATC CCAGCTCCCT GAAGACCTT GTGGCAGCG GTGTATCGG GGCAGTCTC 180
TCAACATGG GTGTGTGGG CATGTGTGGA AATGTATACA CTTTGTGTGT CATGTCCGG 240
TTTCTGGTG CTCTGGGCTC CATGTAGGTC TATGTGTGCA ACCTAGCGCT GGTGTATCTG 300
CTGTACCTGG TGAGCATTC CTTCACTATA GCCACCTAGG TCACTAAGCA CTGGCACTTT 360
GGAGATGTGG GTGCAGAGT CCTCTTTAGC CTGGACTTCC TGACAATGCA GCCAGCATC 420
TTACCCCTGA CCATAATAG CAGCCAGCG TATGCAGCG TACTGAGGCC TCTGGACACA 480
GTCCAGGGCT CCAGGGGTA CCGTAAGCTG CTGGTGTGG GCACCTGGTT GCTGGCACTG 540
CTGCTGACC TACCATGAT GCTTGCATC CAGCTGCTCC GCAGGGGCTC TAAGAGCTTC 600
TGCTTGCCAG CTGGGGGCC TCGTGGCCAC GGTACTTACC TAACGTTGCT CTTTGGGACC 660
AGCATTGTGG GGCCTGGCTT GGTCAATTGG GTGCTCTATG TCCGTCTGGC CAGGACCTAC 720
TGCCTATCTC AGCAGCTTC TTTCAGCAG ACAGGGGGC TGCCCAAGCC CAGGCTGCTC 780
TACCTCATCC TTGGTATGCT CCTTCTCTC TGGGGCTGCT TTCTACCCCT CTGGCTGTGG 840
CAGCTGCTGG CCCAGTACA CGAGGCCATG CCATCTACTC CGCAGACTGC AUCATTGTC 900
AATACCTGA CCAGCTGCT CACTATGGC AACAGTTGCA TCAATCCCTT CCTCTACACT 960
CTGCTACCA AGAATATCG AGAGTACTA CGTGGCCGCC ACCGGTCACT GGTAGTAGT 1020
TGCACAGCC CAGGGAGTCC TGGCAGCTTC CTGCCAGCC GAGTCCACCT CCAGCAGGAC 1080
TCCGGCCGCT GGTGTCTC CAGCAGCCAA CAGGCCACAG AGACCTCAT GCTGTCTCCA 1140
GTCCCCGTA ACCGGGCCCT TCTCTGAGAG TGCATCTGCG AATACTAGT 1189

<210> 4

<211> 326

<223> RNA

<213> Unknown

<220>

<223>

<400> 4

CAGAGGCGG AGGUCACCG GGGUGGGGG GGGUUAACU AGUAUCCAC AGUCACUCU 60
 CAGAGAGGG CCCCCHACG GGGGACUGG GACAGCAUGA GGGUUCUGU GGGCUGUUGG 120
 CUGCUGGAGG ACAGCGAGG GCGCGAGUC UGCUGGAGGU GGACUCGGU GGGCAGGAAG 180
 CUGCCAGGAC UCCUGGGGU GUHGAACUA CUACCCAGUG ACCGCGGGG GCGCAGUAGG 240
 UACUUCGAGU AGUUCUUGU GAGCAGAGU UAGAGGAAGG GAUUGAGCCA ACUGUUGCCA 300
 UAGUGAGGC AGGUGUCAG GUAGUU 326

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Pig

<220>

<221>

<223>

<400> 5

Gly Pro Thr Ser Glu Xaa Phe Trp Lys Tyr Xaa Val
 1 5 10 12

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Pig

<220>

<221>

<223>

<400> 6

Gly Pro Pro Ser Glu Xaa Phe Trp Lys Tyr Xaa Val
 1 5 10 12

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Pig

<223> The 6th cystein residue binds with the 11th cystein residue to form
 a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 7

Gly Pro Thr Ser Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 1 5 10 12

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Pig

<223> The 6th cystein residue binds with the 11th cystein residue to form
 a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 8

Gly Pro Pro Ser Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 1 5 10 12

<210> 9

<211> 386

<212> PRT

<213> Pig

<400> 8

5/20

6/20

Met Ala Leu Ser Leu Glu Ser Thr Thr Ser Phe His Met Leu Thr Val
1 5 10 15
Ser Gly Ser Thr Val Thr Glu Leu Pro Glu Asp Ser Asn Val Ser Leu
20 25 30
Asn Ser Ser Trp Ser Gly Pro Thr Asp Pro Ser Ser Leu Lys Asp Leu
35 40 45
Val Ala Thr Gly Val Ile Gly Ala Val Leu Ser Ala Met Gly Val Val
50 55 60
Gly Met Val Gly Asn Val Tyr Thr Leu Val Val Met Cys Arg Phe Leu
65 70 75 80
Arg Ala Ser Ala Ser Met Tyr Val Tyr Val Val Asn Leu Ala Leu Ala
85 90 95
Asp Leu Leu Tyr Leu Leu Ser Ile Pro Phe Ile Ile Ala Thr Tyr Val
100 105 110
Thr Lys Asp Trp His Phe Gly Asp Val Gly Cys Arg Val Leu Phe Ser
115 120 125
Leu Asp Phe Leu Thr Met His Ala Ser Ile Phe Thr Leu Thr Ile Met
130 135 140
Ser Ser Glu Arg Tyr Ala Ala Val Leu Arg Pro Leu Asp Thr Val Gln
145 150 155 160
Arg Ser Lys Gly Tyr Arg Lys Leu Leu Val Leu Gly Thr Trp Leu Leu
165 170 175
Ala Leu Leu Thr Leu Pro Met Met Leu Ala Ile Gln Leu Val Arg
180 185 190
Arg Gly Ser Lys Ser Leu Cys Leu Pro Ala Trp Gly Pro Arg Ala His
195 200 205
Arg Thr Tyr Leu Thr Leu Leu Phe Gly Thr Ser Ile Val Gly Pro Gly

210 215 220
Leu Val Ile Gly Leu Leu Tyr Val Arg Leu Ala Arg Ala Tyr Trp Leu
225 230 235 240
Ser Gln Gln Ala Ser Phe Lys Gln Thr Arg Arg Leu Pro Asn Pro Arg
245 250 255
Val Leu Tyr Leu Ile Leu Gly Ile Val Leu Leu Phe Trp Ala Cys Phe
260 265 270
Leu Pro Phe Trp Leu Trp Gln Leu Leu Ala Gln Tyr His Glu Ala Met
275 280 285
Pro Leu Thr Pro Glu Thr Ala Arg Ile Val Asn Tyr Leu Thr Thr Cys
290 295 300
Leu Thr Tyr Gly Asn Ser Cys Ile Asn Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Leu
305 310 315 320
Thr Lys Asn Tyr Arg Glu Tyr Leu Arg Gly Arg Gln Arg Ser Leu Gly
325 330 335
Ser Ser Cys His Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Phe Leu Pro Ser Arg
340 345 350
Val His Leu Gln Gln Asp Ser Gly Arg Ser Leu Ser Ser Ser Gln
355 360 365
Gln Ala Thr Glu Thr Leu Met Leu Ser Pro Val Pro Arg Asn Gly Ala
370 375 380
Leu Leu
385
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 10

GATTCTCTG GACAGATCC 20

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 11

TCAGACACAG TATTTCCAGA AGCA 24

<210> 12

<211> 70

<212> DNA

<213> Pig

<400> 12

TAACATTTT CTGAGTCACC TTTTGGCCAG AATCAGAAA CCATACAAGA AAGCTGGGCC 60

CCCTCTGAA

70

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

TACATTTT CTGAGTCACC TTTTGGCCAG AATCAGAAA CCAT 44

<210> 14

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 14

TTCAGAGGGG GCGCCACGTT TCTGTATGG TTCTTGATT CTGGCC 46

<210> 15

<211> 638

<212> DNA

<213> Pig

<220>

<223>

<400> 15

CGGACCAACA GAAGCCAGCA AGCAAGTCTC CTGCTCTCTG CCAGTCATGT CCAGCTGGT 60

CCCTGGCTTG CTGCTCTAG GATGCTTAGG TCTCTCTTTC GCTCTTCCG TCCCTGACTC 120

CAGGAAGAG CCCCTGCCCT TCTCAGCACC TGAGATGTC AGATCAGCTT GGGATGAGCT 180

GGAAGAGCC TCCCTTCTC AGATCTGCC AGAGAGCCCA GCTCCAGAGG CAGGAGAGGA 240

TCTCAGGCA GCAGATGCCG GAATGGACAT TTTTACCCA AGAGGAGAAA TCAGAAAGCC 300

TTTCTGGA CAGATCTTA ACATTTTCT GAGTCAGCTT TTGGCCAGAA TCAGAAAGCC 360

ATACAGAAA CTTGGGCCC CCTCTGATG CTTCGGAAA TACTGTGCTT GAAGTCACCT 420

CAGACACAC CATCTTAGA AATCTAATAA AGTGCTTGA CTTCACAGCA GTCCAGATCA 480

AAMCCAGG AAGCCTACT CTGTACTA TTATCTGAA AATAACCT TTGCTTTGG 540

CCAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA 600

AAAAAATA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA 638

<210> 16

<211> 583

<212> DNA

<213> Pig

<400> 16

GACCACACA AGCCAGCAGC GAGTGTCTCT CCTCTGCCC AGTCATGTCC AGCTGTGCC 60
CCTCTTGCT CTTCTAGGTC TCTCTTGCC TCTTCCGTC CTTGACTCCA 120
GGAAAGGCC CTTGCCCTTC TCAGCACCTG AGATGTCTAG ATCAGCTTGG GACGAGCTGG 180
AAGAGCCTC CTTCTTCAG ATCTGCCAG AGACGCCAGG TCCAGAGCCA GGAGAGGATC 240
TCAGGAGGC AGATGCCGGA ATGGACATTT TTTACCCAG AGGAGAAATG AGAAGGCTT 300
TCTCTGGACA AGATCCTAAC ATTCTTCTGA GTCACTTTT GCGCAGAAATC AGAAGACCAT 360
ACAGAAAGC TGGGCCGCCC TCTGAATGCT TCTGGAAATA CTGTGTCTGA AGTCACCTCA 420
ACACACCCA TCTTAGAAAA TGTAAAAA GTCTTGACT TCACAGCACT GCAGATGAAA 480
AACCAGCAA ACCCTACTCT GTTCACTATT ATCTGGAAA TAAACCTTT GTGTTTGCCA 540
AGTTAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 583

<210> 17

<211> 522

<212> DNA

<213> Pig

<400> 17

AGTTGAGCT TGGACCAAC AGAAGCCAGG AAGGAAGTGT CCTGCTCCT GCCAGTCATG 60
TCAAGCTGG TCGCTGCTT GCTGCTCTA GGATGCTTAG GTCTGCTCTT GCGCTTGCC 120
GTCCCTGACT CCAGGAMGA GCGCCTGCC TTCTCAGATG CCGGAATGGA CATTITTTAC 180
CCAGAGGAG AATTCAGAA GCGTTTCTCT GGACAGATC CTAAACATTTT TCTGAGTCAC 240
CTTTTGGCCA GAATCAAGAA ACCATACAG AAGCTGGGC CCGCTCTGA ATGCTTCTGG 300
AATACTGTG TCTGAGTCA CTTCAACAC ACCATCTTA GAAATGTAA AAAAAAGTCT 360
TGACTTGACA GCAGTGCAGA TGAATAACCA GGCANCCCT ACTCTGTTCA CTATTATCTG 420
GAATATAAC CTTTGTGTT TGGCAGTTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 480

AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA

522

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Pig

<400> 18

Met Ser Lys Leu Val Pro Cys Leu Leu Leu Gly Cys Leu Gly Leu 15
1 5 10
Leu Phe Ala Leu Pro Val Pro Asp Ser Arg Lys Glu Pro Leu Pro Phe 30
20 25
Ser Ala Pro Glu Asp Val Arg Ser Ala Trp Asp Glu Leu Glu Arg Ala 45
35 40
Ser Leu Leu Glu Met Leu Pro Glu Thr Pro Gly Ala Glu Ala Gly Glu 60
50 55
Asp Leu Arg Glu Ala Asp Ala Gly Met Asp Ile Phe Tyr Pro Arg Gly 80
65 70 75
Glu Met Arg Lys Ala Phe Ser Gly Gln Asp Pro Asn Ile Phe Leu Ser 95
85 90
His Leu Leu Ala Arg Ile Lys Lys Pro Tyr Lys Lys Arg Gly Pro Pro 110
100 105
Ser Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val 120
115
<210> 19
<211> 85
<212> PRT
<213> Pig
<400> 19

12/20

12

5

10

1

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Human

<223> The 5th cysteine residue binds with the 10th cysteine residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 22

Glu Thr Pro Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val

1

5

10

11

<210> 23

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 23

TCTGAGTCG ACCACCATGG CGCTGACCCC CGAGTCC 37

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 24

GCCTGGACTA GTGCGGCCCC TCGCGTGCT CAC 33

<210> 25

11/20

Met Ser Lys Leu Val Pro Cys Leu Leu Leu Gly Cys Leu Gly Leu

1

5

10

15

Leu Phe Ala Leu Pro Val Pro Asp Ser Arg Lys Glu Pro Leu Pro Phe

20

25

30

Ser Asp Ala Gly Met Asp Ile Phe Tyr Pro Arg Gly Glu Met Arg Lys

35

40

45

Ala Phe Ser Gly Gln Asp Pro Asn Ile Phe Leu Ser His Leu Leu Ala

50

55

60

Arg Ile Lys Lys Pro Tyr Lys Lys Arg Gly Pro Pro Ser Glu Cys Phe

65

70

75

80

Trp Lys Tyr Cys Val

85

<210> 20

<211> 67

<212> DNA

<213> Rat

<400> 20

GCCTTTCCTG ACTGACCTTT TGTCCAGAT TAGGAACAA TCTAGAAC GTGGACCTC 60

CTCTGAA

67

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Rat

<223> The 6th cysteine residue binds with the 11th cysteine residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 21

Gly Pro Ser Ser Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val

<211> 1215

<212> DNA

<213> Human

<400> 25

TGCTGAGCTGG ACCACATGCG CGATGACCCG GAGTCCCGG ACCAGCTTCC CTGGGCTGGC 60
 GCGCACCGGC AGCTCTGTGG CGGAGCGCGG TGGTGGGCCC AAGCAAGCC TCACAGCTC 120
 CTGGGCGCAGC CGGACCGAGC CGAGCTCCCT GGAGGACCTG GTGGGCACGG GCACCATTGG 180
 GACTCTGCTG TGGGCCATGG CGGTGTGGG CGTGTGGGG AACGCTACA CGCTGTGCT 240
 CAGCTGCCGC TCCTTGCCTG CGGTGGCTC CATGTAGCTC TACGTGGTCA ACCTGGCGCT 300
 GCGCGAGCTG CTGTAGCTGC TCAGCATGCC CTTTCATGCTG GCCACTAGG TCACCAAGGA 360
 GTGGCACTTC GCGGAGCTGG CTTGCCCGCT GCTCTTCGGC CTGGACTTCC TGACCATGCA 420
 GCGCAGCATC TTACGCTGA CCGTCAATAG CAGCGAGCGC TACGCTGGGG TCGTGGGGC 480
 GCTGGACACC GTGCAGCGCC CCAGGGGCTA CCGCAAGCTG CTGGGCTGG GCACCTGGCT 540
 GCTGGCGCTG CTGCTGAGC TGGCTGTGAT GCTGGGCATG CCGCTGGTGG GCGGGGCTCC 600
 CAGAGGCTTG TGGCTGCCCG CTTGGGGCCC GCGCGGCCAC CCGCGCTACC TGACGCTGCT 660
 CTTGCGCACC AGCATCGCGG GCGCGGCGCT CCTCATTCGG CTGCTCTAGC CCGGCTTGGC 720
 CCGCGGCTAC GCGGCTGCG AGCGGCGCTC CTTCAAGCGG GCGCGGCGGC CCGGGCGCGG 780
 CCGGCTGCGC CTGCTGCTGG GCATGCTGCT GCTCTTCTGG GCTGCTTCC TGCCCTTCTG 840
 GCTGTGGCAG CTGCTGCGCC AGTACAGCA GCGCGCGCTG GCGCGCGGCA CCGGCGGCGAT 900
 CGTCAACTAC CTGACCACT CCGTCACTA CCGCAACAGC TGCGCCAACC CCTTCTCTTA 960
 CAGGCTGCTC ACCAGGAAGT ACAGGAGCA CTTGCGCGGC CCGCTGGGG GCGCGGCGAG 1020
 CCGGGGAGGC CCGGGGCGCG TTCCCTCCCT GAGGCGCGCG GCGCGCTTCC AGCGCTTTC 1080
 GCGCGGCTCC CTGCTTCTCT CCAGCCACA GCGCACTGAC AGCCTGCTGC TGGCGCGCAG 1140
 GCGCGCGCGC CGAGCTGCCC CCGAGGGTCC CAGGGGCTCC GCGTGAGCAC GCGGAGGGGC 1200
 GGCATGATGC CAGGC 1215

<210> 26

<211> 389

<212> PRT

<213> Human

<400> 26

Met Ala Leu Thr Pro Glu Ser Pro Ser Ser Phe Pro Gly Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Ser Val Pro Glu Pro Pro Gly Gly Pro Asn Ala Thr Leu
 20 25 30
 Asn Ser Ser Trp Ala Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Leu Glu Asp Leu
 35 40 45
 Val Ala Thr Gly Thr Ile Gly Thr Leu Leu Ser Ala Met Gly Val Val
 50 55 60
 Gly Val Val Gly Asn Ala Tyr Thr Leu Val Val Thr Cys Arg Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Ala Val Ala Ser Met Tyr Val Tyr Val Val Asn Leu Ala Leu Ala
 85 90 95
 Asp Leu Leu Tyr Leu Leu Ser Ile Pro Phe Ile Val Ala Thr Tyr Val
 100 105 110
 Thr Lys Glu Trp His Phe Gly Asp Val Gly Cys Arg Val Leu Phe Gly
 115 120 125
 Leu Asp Phe Leu Thr Met His Ala Ser Ile Phe Thr Leu Thr Val Met
 130 135 140
 Ser Ser Glu Arg Tyr Ala Ala Val Leu Arg Pro Leu Asp Thr Val Gln
 145 150 155 160
 Arg Pro Lys Gly Tyr Arg Lys Leu Leu Ala Leu Gly Thr Trp Leu Leu
 165 170 175
 Ala Leu Leu Thr Leu Pro Val Met Leu Ala Met Arg Leu Val Arg
 180 185 190

15/20

16/20

Arg Gly Pro Lys Ser Leu Cys Leu Pro Ala Trp Gly Pro Arg Ala His
195 200 205
Arg Ala Tyr Leu Thr Leu Leu Phe Ala Thr Ser Ile Ala Gly Pro Gly
210 215 220
Leu Leu Ile Gly Leu Leu Tyr Ala Arg Leu Ala Arg Ala Tyr Arg Arg
225 230 235 240
Ser Gln Arg Ala Ser Phe Lys Arg Ala Arg Arg Pro Gly Ala Arg Ala
245 250 255
Leu Arg Leu Val Leu Gly Ile Val Leu Leu Phe Trp Ala Cys Phe Leu
260 265 270
Pro Phe Trp Leu Trp Gln Leu Leu Ala Gln Tyr His Gln Ala Pro Leu
275 280 285
Ala Pro Arg Thr Ala Arg Ile Val Asn Tyr Leu Thr Thr Cys Leu Thr
290 295 300
Tyr Gly Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe Tyr Thr Leu Leu Thr Arg
305 310 315 320
Asn Tyr Arg Asp His Leu Arg Gly Arg Val Arg Gly Pro Gly Ser Gly
325 330 335
Gly Gly Arg Gly Pro Val Pro Ser Leu Gln Pro Arg Ala Arg Phe Gln
340 345 350
Arg Cys Ser Gly Arg Ser Leu Ser Ser Cys Ser Pro Gln Pro Thr Asp
355 360 365
Ser Leu Val Leu Ala Pro Ala Ala Pro Ala Arg Pro Ala Pro Gly
370 375 380
Pro Arg Ala Pro Ala
385
<210> 27

<211> 36
<212> DNA
<213> Pig
<400> 27
GGCCCCCCT CTGAATGCTT CTGGAATAC TGTGTC 36
<210> 28
<211> 36
<212> DNA
<213> Bovine
<400> 28
GGACCTTCCT CTGAATGCTT CTGGAATAC TGTGTC 36
<210> 29
<211> 122
<212> PRT
<213> Bovine
<400> 29
Met Tyr Lys Leu Val Ser Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Ser Leu Asn
1 5 10 15
Pro Leu Leu Ser Leu Pro Val Leu Asp Ser Arg Gln Glu Ser Leu Gln
20 25 30
Leu Leu Ala Pro Glu Asp Val Arg Ser Thr Leu Asp Glu Leu Arg
35 40 45
Ala Ser Leu Leu Gln Met Leu Pro Glu Met Ser Gly Ala Glu Thr Gly
50 55 60
Glu Gly Leu Arg Asn Thr Asp Pro Ile Thr Asn Ile Phe Tyr Pro Arg
65 70 75 80
Gly Asn Met Arg Lys Ala Phe Ser Gly Gln Asp Pro Lys Leu Phe Leu

85 90 95

Ser Asp Leu Leu Ser Arg Ile Arg Lys Gln Ser Lys Lys Arg Gly Pro

100 105 110

Ser Ser Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val

115 120

<210> 30

<211> 431

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 30

ATGATAAGC TGGTCTCTG CTGTTTGCTT TTCATAGGAT CCTTAATCC GCTCCTGCT 60

CTTCCTGTCC TTGACTCCAG GCAAGAGTCC CTGCAGCTCT TAGCACCTGA AGATCTCAGA 120

TCAACTCTGG ATGAGCTGGA AGAGGCTCT CTTCGCGAGA TGTGCCAGA GATGTCAGGC 180

GCAGACAG GAGAGGCTCT TAGGACACA GATCCATTA CCACATTTT TTACCCAGA 240

GGAACATGA GAAAGGCTT CTCTGGGCA GATCCTAAGC TTTTCTCGAG TGACCTTTTG 300

TCCAGATTA GGAACAATC TAAAGAACCT GGACCTTCTCT CTGAATGCTT CTGGAAATAC 360

TGTGCTGCA GCAAMATGAC CCTCTACTAG TTACCTCCAA GACGACCATC TGAGAAATG 420

TAAATMAG A 431

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 31

GAAGCATTC A GAGGAGGTC CAC 23

<210> 32

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 32

AAGGTCACG TTGCTTAGAT TGTTCCTA 29

<210> 33

<211> 415

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 33

CTCTACACT GGACTCTACC CCCGAGAGG ACCAAGTTGG AAGAGCTAA GAAGGAGAC 60

TTCTATCTCC TCCCAATCAT GTATAAGCTG GTCTCCTGCT GTTTCCTTTT CATAGCATCC 120

TTAAATCCGC TCCTGTCTCT TCCTGTCTCT GACTCCAGGC AAGAGTCCCT GCAGCTCTTA 180

GGACCTGAAG ATGTCAGATC AACTCTGGAT GAGCTGGAA GAGGCTCTCT TCTGCAGATC 240

CTGCCAGAGA TCTCAGGCGC AGACACAGGA GAGGCTCTTA GCAACACAGA TCCATTACC 300

AACATTTTTT ACCCAGAGG AACATGAGA AAGGCTTCT CTGGGCAGA TCCTAAGCTT 360

TTCTGAGTG ACCTTTTGT CAGAAATTAGG AACAACTTA AGAAACCTGG ACCTT 415

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 34

GGCAGAGATC CTAAGCTTTT CCTGAGTGAC 30

<210> 35
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 38
ACACTGTTTT CAATCAAGC A 21
<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> Gillichthys mirabilis
<223> The 6th cystein residue binds with the 11th cystein residue to form
a intra-molecular disulfide-bond.
<400> 39
Ala Gly Thr Ala Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
1 5 10 12

<210> 35
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 35
GCTTTTCCTG AGTCACCTTT TGTCCAGAAAT TAGG 34
<210> 36
<211> 240
<212> DNA
<213> Bovine
<400> 36
GCTTTTCCTG AGTCACCTTT TGTCCAGAAAT TAGGAACAA TCTAAGAAC GTGACCTTC 60
CTCTGAATGC TTCTGGAAAT ACTGTGCTG AACCAAAATG ACCCTCTACT AGTTACCTCC 120
AAGACGACCA TCTGAGAAA TGTAAATATA AGATGCTTGA TTGAAAGCA GTATAGATGA 180
AAACTAGGC AAGCTAGACC CTGTTCAITTA TTATTGGAA ATTAATCCT CTATGTTTTG 240
<210> 37
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 37
GGTAGACTTC TATCTCTGC CAATC 25
<210> 38
<211> 21

International application No.
PCT/JP99/06649

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. CI¹ C07K 14/00-16/46, C12N 15/00-90, C12N 1/00-5/28, C12P 21/00-08, A61P 1/00-27/00

Documentation searched other than minimal documentation to the extent and level of documentation for:

NEW (21000) / 21000 (21000)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
	Citation of document with indication where occupants of the relevant passenger	
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		
43		
44		
45		
46		
47		
48		
49		
50		
51		
52		
53		
54		
55		
56		
57		
58		
59		
60		
61		
62		
63		
64		
65		
66		
67		
68		
69		
70		
71		
72		
73		
74		
75		
76		
77		
78		
79		
80		
81		
82		
83		
84		
85		
86		
87		
88		
89		
90		
91		
92		
93		
94		
95		
96		
97		
98		
99		
100		

Category	Clarity of document, with indication, where appropriate, of the relevant page	
PX	Nature, Vol. 401, No. 6750, (Sep. 1999), p. 282-286,	1-4
PY	Robert S. Ames, et al., "Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14"	5-23
PX	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95, No. 26, (Dec. 1998),	1-4
PY	p. 15803-15808, Yolaïne Coulouarn et al., "Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord"	5-23
PX	Biochem. Biophys. Res. Commun., (Nov. 1999), Vol. 265, No. 1,	1-11
PY	p. 123-129, Mori M. et al., "Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SSTR (GPR14)"	12-23
PX	WO, 99/35266, A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP. et al.),	5-10
PY	15 July, 1999 (15.07.99) (family: none)	1-23

FURTHER CATEGORIES ARE USED IN THE COMBINATION OF BOX C		ONE PRIORITY CATEGORY	
		1	2
Special categories of cited documents:			
"A"	document defining the general state of the art which is not cited to establish the prior art		later document published after the international filing date or priority date and the principle of novelty underlying the invention
"B"	any document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the prior art	"Y"	
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later	"Z"	document member of the same priority family

15 JULY 2000 (JULY) 2000

Facsimile No. _____ Telephone No. _____

國際出版番号 ICT/JP99/06649

Int. C) C07K 14/46, C12N 15/12, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, A61P 25/00, A61P 9/00, A61P 13/00, A61P 27/00, G01N 33/53

Int. C: C07K 14/00~16/46, C12N 15/00~90, C12N 1/00~5'28, C12P 21/00~08, A61P 1/00~27/00
G01N 33/53~98

引用文献の カテゴリ *	引用文献名、及び一節の頁所が関連するときは、その関連する頁所の指示	記述の範囲の番号 関連する

$$\frac{PX}{PY} = \frac{1-4}{5-23}$$

☒ C欄の続きにも文様が列挙されている。

★ 引用文献のカテゴリー

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで証明
 以後に公表されたもの
 成年男子頭部に豆莢を埋入する文章は前掲の文献の取捨
 の新個性又は通称性がないと考えられるもの

【○】 朗明による開示、使用、展示等に及ぼす文獻
よつて進歩性がないと考えられるもの
（○） 四一がエントフタミリー文獻

国際口座を完了した日	14.03.00	国際郵便物の発送日	28.03.00
------------	----------	-----------	----------

日本國特許庁 (JSA/JP)
 郵便番号 100-8915
 東京都 其由委
 印

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告		国際出版番号 PCT/JP99/06649	
C (特許) 引用文献の カテゴリ--*	関連すると思われる文献	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X P Y		Biochem. Biophys. Res. Commun., (Nov. 1999), Vol. 265, No. 1, p. 123-129. Wori M et al., "Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14)" WO, 99/35266, A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP. et al.) 15. 7月. 1999 (15. 07. 99), プアミリーなし	1-11 12-23 5-10 1-23
P X P Y			